

Untersuchung von polymerstabilisierten Repellentsuspensionen auf Hartfettbasis

Vom Fachbereich für Chemie und Pharmazie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Andreas Melhorn
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. R. Daniels

2. Referent: Prof. Dr. R. H. Müller

eingereicht am: 26. Mai 2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 15. September 2005

Druckjahr 2005

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die nette und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. R. H. Müller danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Auch bei Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann möchte ich mich bedanken für den allgemein freundlichen Umgang und die Bereitschaft jederzeit Fragen zu beantworten und fachliche Diskussionen zu führen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danke ich für die nette und warme Arbeitsatmosphäre, die ständige Diskussionsbereitschaft und die erwiesene Freundschaft, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen und diese so angenehm gemacht haben. Im Besonderen danke ich Frau Jahn, die einige Messungen am PIDS für mich durchgeführt und mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt hat. Dank geht auch an Karin Becker, die einige Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop für mich vorgenommen hat.

Dr. Emeis von der Fa. Beiersdorf danke ich dafür, dass ich bei ihm die NMR-Messungen durchführen konnte und für die langen und fruchtbaren Diskussionen.

Herrn Dr. Robert Hänsch vom Institut für Pflanzenbiologie sowie Herrn Hanno Dierke vom Institut für Metallphysik und Nukleare Festkörperphysik der TU Braunschweig danke ich für die Möglichkeit, Untersuchungen am TEM durchzuführen.

Natürlich danke ich an dieser Stelle auch allen Firmen, die mir Substanzen zur Verfügung gestellt haben.

Zum Abschluss danke ich Frau Stefanie Döhring für die Unterstützung und das Korrekturlesen.

Publikationen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Chemie und Pharmazie, vertreten durch Prof. Dr. R. Daniels, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Melhorn, A. und Daniels, R.:

Stability of *N,N*-diethyltoluamide containing suspensions that are stabilised by the polymeric emulsifier hydroxypropylmethylcellulose

Proc. 4th World Meeting A.D.R.I.T.E.L.F./APV/APGI, Florenz, 8/11 April 2002, 437

Melhorn A. und Daniels R.:

Investigation of two different solid lipids containing *N,N*-diethyltoluamide with differential scanning calorimetry

Proc. International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nuremberg, 15-18 March 2004, 681

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Repellentien	3
2.1.1	Erwünschte Eigenschaften von Repellentien	5
2.1.2	<i>N,N</i> -Diethyl-m-toluamid (DEET)	6
2.1.3	Repellentformulierungen	9
2.2	Stabilisierung von zweiphasigen Systemen	11
2.2.1	Stabilisierung disperser Systeme mit Polymeren	14
2.2.2	Hypromellose als Polymeremulgator	16
2.3	Die Haut	17
2.4	Dermale Resorption	20
2.5	Arzneimittelfreisetzung aus Dermatika	23
3	Material und Methoden	25

3.1	Material	25
3.1.1	Insektenrepellent	25
3.1.2	Lipidphase der Suspension	26
3.1.3	Stabilisatoren	26
3.1.4	Wasser	27
3.1.5	Zusätze	27
3.2	Methoden	27
3.2.1	Herstellung der Suspensionen	27
3.2.2	Herstellung von Lipid-DEET-Gemischen	28
3.2.3	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	29
3.2.4	Bestimmung des Hartfett/Wasser-Verteilungskoeffizienten	29
3.2.5	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	30
3.2.6	Mikroskopie/Polarisationsmikroskopie	30
3.2.6.1	Untersuchung der Suspensionen	30
3.2.6.2	Untersuchung des Lipid-Fett-Gemisches	31
3.2.6.3	Untersuchung des Abkühlvorgangs	31
3.2.7	PIDS	31
3.2.8	Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	32
3.2.9	NMR-Spektrometrie	33
3.2.10	Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)	33

3.2.11	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)	34
4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Zusammensetzung der Lipidsuspensionen	35
4.1.1	Auswahl der Bestandteile	35
4.1.1.1	Wirkstoff	36
4.1.1.2	Innere Phase der Suspension	37
4.1.1.3	Stabilisatoren	37
4.1.1.4	Konservierungsmittel	38
4.1.2	Konzentration der Bestandteile	38
4.2	Vorversuche	39
4.3	Verhalten von DEET-Lipid-Gemischen	42
4.3.1	Mischbarkeit der Lipide mit DEET	42
4.3.2	Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	46
4.3.2.1	Lipid-DEET-Mischungen	46
4.3.3	Röntgenstrukturanalyse	46
4.3.3.1	WAXD (DEET-Lipid-Mischungen)	46
4.3.3.2	SAXD (DEET-Lipid-Mischungen)	53
4.3.4	Schmelzverhalten der gelagerten Proben	56
4.3.4.1	DSC-Untersuchungen mit Suppocire C	56
4.3.4.2	DSC-Untersuchungen mit Suppocire NA50	59

4.3.4.3	DSC-Untersuchungen mit Suppocire AM	61
4.3.4.4	Fazit der DSC-Untersuchungen	65
4.3.5	NMR	65
4.4	Verhalten der Suspensionen	69
4.4.1	Hartfett/Wasser-Verteilungskoeffizient	69
4.4.2	Einfluss der DEET-Konzentration	71
4.4.3	Stabilisierung mit Tensiden	71
4.4.4	Einfluss der Hypromellose	73
4.4.5	Abkühlvorgang	74
4.4.6	Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	78
4.4.6.1	Suspensionen	78
4.4.7	Teilchengrößenuntersuchungen	78
4.4.7.1	Suspensionen mit Suppocire C	80
4.4.7.2	Suspensionen mit Suppocire AM	87
4.4.7.3	Suspensionen mit Suppocire NA50	91
5	Abschlussdiskussion	96
5.1	Beobachtungen bei der Lagerung der Suspensionen	98
5.2	Mischbarkeit von DEET mit Hartfett	99
5.3	Röntgenstrukturanalyse	100
5.4	Schmelzverhalten der gelagerten Proben	101

5.5	Abkühlvorgang	102
5.6	Teilchengrößenmessungen	103
5.7	Abschlussbetrachtung	105
6	Zusammenfassung	107

Warenrechtlich geschützte Namen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Kapitel 1

Einleitung und Problemstellung

Mücken und andere blutsaugende Parasiten stellen nicht nur ein lästiges Übel dar, weil ihre Stiche und Bisse von Begleiterscheinungen wie juckenden Quaddeln und damit verbundenen Sekundärinfektionen begleitet werden, sondern sind auch eine nicht zu unterschätzende Gefahr für die Gesundheit. Malaria, FSME, Gelbfieber oder die gefährliche Lyme-Borreliose können auf diesem Weg auf den Menschen übertragen werden.

Insektenrepellents sind eine relativ sichere Möglichkeit, Stiche oder Bisse zu vermeiden, besonders wenn sie in Kombination mit anderen abwehrenden Methoden wie Fliegennetzen eingesetzt werden. Da es vielen Menschen unmöglich ist, ihre Kleidung oder ihren Aufenthaltsort auf die Gefahren abzustimmen, stellen für sie Insektenrepellents häufig den einzigen Schutz dar. Das weltweit am weitesten verbreitete Insektenrepellent ist das *N,N*-Diethyl-m-toluamid (DEET).

Repellents müssen je nach Dauer des Aufenthaltes im gefährdeten Gebiet teilweise über lange Zeit angewendet und großflächig auf die Haut aufgetragen werden. DEET wirkt in sehr kleinen Konzentrationen in der Gasphase über der Haut und kann bei Aufnahme durch die Haut zu unerwünschten, teilweise gefährlichen Nebenwirkungen führen. Aus diesen Gründen ist eine langsame kontrollierte Abgabe des Wirkstoffs an die Umgebung und ein langes Verbleiben auf der Haut wünschenswert – Eigenschaften, die durch das Vehikel wesentlich beeinflusst werden können. Resorption und Wirkdauer können positiv beeinflusst

werden, indem DEET in einem dispersen System verarbeitet und angewendet wird. Da die Löslichkeit von DEET in Wasser recht gering ist und es einen hohen Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten besitzt, wirkt das Wasser als Diffusionsbarriere und verlangsamt auf diese Weise die Freisetzung des Repellents.

Die Inkorporierung von DEET in die disperse Lipidphase einer O/W-Emulsion hat sich jahrelang in der Praxis bewährt. Die Einarbeitung von DEET in eine Suspension sollte die Wirkstofffreisetzung weiterhin verlangsamen, da die Diffusion des Stoffs durch einen Feststoff langsamer stattfindet als durch eine Flüssigkeit. Da nur sehr kleine Konzentrationen von DEET in der Gasphase über der Haut für die Wirkung benötigt werden, kann trotzdem mit einer ausreichenden Schutzwirkung gerechnet werden.

Die bei der Herstellung von Emulsionen und Suspensionen häufig genutzten Tenside können sensibilisierend und reizend auf die Haut wirken. Auch die potenziell penetrationsverbessernde Wirkung kann sich nachteilig bei der Anwendung eines entsprechenden Repellents erweisen. Polymeremulgatoren weisen aufgrund ihrer Molekülgröße diese Nachteile nicht auf und bilden somit eine gute Alternative zu den herkömmlichen Tensiden. Eventuell kann die auf die Partikel aufgelagerte viskose Polymerschicht zu einer weiteren Verringerung der Wirkstofffreisetzung führen.

In einer früheren Arbeit ist es zwar gelungen DEET-haltige Emulsionen mit Polymeren zu stabilisieren, in Vorversuchen hergestellte DEET-haltige Suspensionen auf Triglyceridbasis waren jedoch instabil geblieben.

Ziele der Arbeit sind deshalb:

- Gründe für die beobachtete Instabilität zu finden.
- Polymerstabilisierte DEET-haltige Suspensionen auf Lipidbasis zu formulieren und auf ihre Lagerstabilität zu untersuchen.
- Die Kristallisation von DEET-Hartfettmischungen zu untersuchen, um hieraus Ursachen für die beobachtete Instabilität ableiten zu können.

Kapitel 2

Allgemeiner Teil

2.1 Repellentien

Es gibt unterschiedliche Definitionen, was Repellentien (oder: Repellents) eigentlich sind, manche mehr, manche weniger allgemein gehalten. Alle Definitionen besagen, dass Repellentien angewendet werden, um Ektoparasiten wie Mücken, aber auch Fliegen, Wespen und Zecken abzuwehren, so dass es nicht zum Stich oder Biss kommt. Damit grenzen sich Repellentien von den Insektiziden ab, deren Anwendungsziel der Tod des Tieres ist [Davis 1985, Sixl 1981].

Im Laufe der Zeit wurde diese Definition um einige Punkte erweitert. Nachdem Repellentien zunächst als Arzneimittel behandelt wurden, fallen sie heute unter die Kosmetika, da der Schutz von Haut und Behaarungssystem nach neueren EU-Kosmetikrichtlinien als kosmetischer Zweck angesehen wird [LMBG 1998]. Dementsprechend können nur topisch angewendete Formulierungen zu den Repellentien gezählt werden. Browne fügt hinzu, dass sie hauptsächlich in der Gasphase wirken [Browne 1977 zitiert von McIver 1981].

Insektenrepellentien spielen eine wesentliche Rolle in der Vermeidung von Krankheiten, die von den oben genannten Parasiten übertragen werden. Besonders bei Krankheiten, gegen die kein Impfschutz existiert, kann ein ausreichender Schutz nur durch Kontaktvermeidung mit dem Überträger mittels Moskitonetzen, entsprechender Kleidung oder eben Repellents

erreicht werden. Malariaprophylaxe sollte wegen sich immer weiter verbreitender Resistenzen beispielsweise auf keinen Fall ausschließlich durch Medikamente erfolgen (wie z. B. bei den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit [DTG 2004], und in der Broschüre „Fernweh“ von der Fa. Bayer [Fernweh] nachzulesen), und auch wenn der Schutz gegen Zecken bei den meisten Repellents nicht so effektiv wie gegen Mücken ist, so sollte auch zur Vermeidung von Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, die Benutzung von Abwehrmitteln in Erwägung gezogen werden [BgVV und RKI 1996a, BgVV und RKI 1996b].

Bei einem von der US-Regierung finanzierten Molekülscreening [Skinner und Johnson 1980] haben sich Amide, Ester, Ether und Alkohole, bei denen sowohl ein lipophiler wie ein hydrophiler Molekülanteil vorliegt, als wirksame Stoffklassen erwiesen [Finkel und Siemer 1986, Skinner und Johnson 1980]. Das Screening ergab außerdem, dass wirksame Verbindungen hochsiedend sind (der Siedepunkt liegt meist zwischen 230 und 260 °C), aber einen hohen Dampfdruck aufweisen müssen. Gabel entdeckte einen Zusammenhang zwischen Wirkdauer und Verdampfungsrate: Eine niedrige Verdampfungsrate erhöht die Wirkdauer [Gabel et al. 1976]. Da Repellents wie das weit verbreitete *N,N*-Diethyl-*m*-toluamid (DEET) schon in sehr kleinen Konzentrationen wirken (siehe Kap. 2.1.2), reicht die Konzentration an DEET in der Luft bei einer niedrigen Verdampfungsrate immer noch aus, um blutsaugende Parasiten zu vertreiben. Je langsamer der Abwehrstoff also verdampft, desto länger verbleibt er auf der Haut, was eine Wirkverlängerung nach sich zieht.

Wie Repellents wirken, konnte bis zum heutigen Tag nicht zufriedenstellend geklärt werden. Mücken werden durch unterschiedliche Stimuli angelockt. Dazu gehören: Licht, Formen, Farben, aber auch die Luftfeuchtigkeit, der Gehalt an Kohlendioxid in der Luft, Wärme und die Anwesenheit von Lockstoffen wie die Aminosäuren Cystin und Glutamin, Ammoniak, Milchsäure oder Buttersäure [Charlet und Finkel 1987, Kahn und Maibach 1966]. Repellents könnten als Antagonisten wirken, indem sie einen oder mehrere dieser Reize blocken. In seinem Review-Artikel über die Wirkungsweise von Insektenabwehrmitteln hält Davis dies allerdings für unwahrscheinlich, da in Versuchen gezeigt wurde, dass die Mücken, die in den Luftstrom eines mit Repellent behandelten Opfers hineinfliegen, umkehren und diesen wieder verlassen. Dies setzt aber voraus, dass die Mücke das Repellent wahrgenommen hat und davon abgestoßen wurde. Wenn die Reize geblockt würden, hätte

sie nichts wahrgenommen und wäre ohne Reaktion durch den Luftstrom hindurchgeflogen [Davis 1985]. Eine weitere mögliche Wirkungsweise wäre bei der Mücke selbst, die durch das Repellent die Reize nicht mehr wahrnehmen kann. Obwohl dies wahrscheinlicher erscheint als die Wirkung als Antagonist des Reizes, da die Mücken im Regelfall zwar landen (also zunächst angelockt werden), dann aber sofort weiterfliegen ohne zu stechen, konnten keine Beweise für diese Wirkungsweise in der Literatur gefunden werden. Eine weitere Theorie besagt, dass eine Wechselwirkung des Abwehrstoffs mit den Lipiden von Zellmembranen als ein möglicher Mechanismus vorliegt [McIver 1981].

Es wird vermutet, dass mehrere Mechanismen zusammenwirken, was die Schwierigkeiten bei der Beweisfindung erklären würde [Davis 1985].

2.1.1 Erwünschte Eigenschaften von Repellentien

Repellentien sollten folgende Eigenschaften haben [Lutz und Jaspersen 1982]:

- wenn möglich, 4–8 h wirken,
- schwerflüchtig sein, um diese Wirkdauer zu garantieren,
- nicht oder nur wenig resorbiert werden, um die angestrebte Wirkdauer zu erreichen und um unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen,
- die Haut nicht irritieren oder sensibilisieren,
- auch nach Verdünnung mit Körperflüssigkeiten (Schweiß) und unter Einwirkung von UV-Strahlen wirken.

Einige dieser Eigenschaften werden nicht nur von den Eigenschaften des Repellents selbst bestimmt, sondern lassen sich auch durch die Wahl einer passenden Formulierung beeinflussen (siehe Kap. 2.1.3).

2.1.2 *N,N*-Diethyl-*m*-toluamid (DEET)

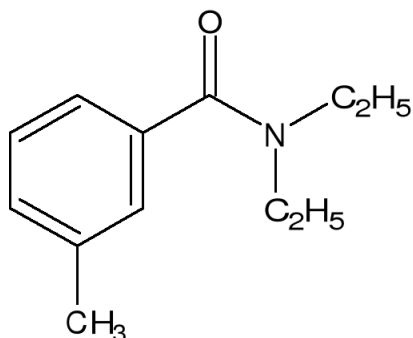
DEET (siehe Abb. 2.1) bleibt seit seiner Markteinführung 1956 in den USA bzw. 1959 in Deutschland eines der effektivsten Repellents gegen viele Parasiten [Brown and Hebert 1997, Fradin und Day 2002]. Viele Jahre Anwendung und Untersuchungen haben dies immer wieder bestätigt. DEET wurde in vielen Publikationen beschrieben und seine Toxizität und Hautpenetration untersucht.

DEET wirkt in schon recht kleinen Konzentrationen. Die minimale effektive Dosis (MED) [Skinner und Johnson 1980] wurde für DEET von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt und liegt bei $<60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Hautoberfläche [Gabel et al. 1976, Maibach et al. 1974, Qiu et al. 1998, Smith et al. 1963]. Die Wirkzeit wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, dazu gehören: Verlust des Repellents durch Abrasion, Abwaschen und Wind; die Umgebungstemperatur [Maibach et al. 1974] und die Menge der aufgetragenen Wirksubstanz. Außerdem ist die Wirkung abhängig von der Art des Parasiten. Die Wirkzeit beträgt im Normalfall über 2 h gegen Mücken. Die Versuchsergebnisse verschiedener Untersuchungen zur Wirkzeit sind von Qiu *et al.* zusammengefasst worden [Qiu et al. 1998].

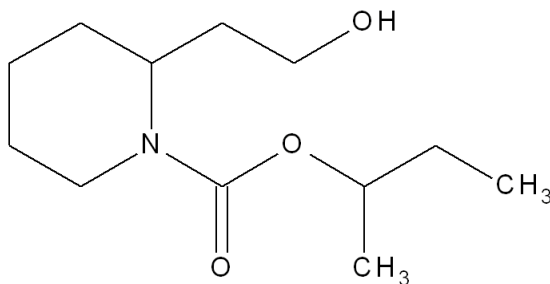
Um den Verbleib des Stoffs nach der Applikation und damit sein Anwendungsrisiko zu klären wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Schmidt hat schon 1959 festgestellt, dass DEET über den Urin von Meerschweinchen ausgeschieden wird, wenn es auf deren Haut zur Anwendung kommt [Schmidt et al. 1959]. Selim hat später die gleiche Beobachtung bei freiwilligen Testpersonen gemacht [Selim et al. 1995]. Eine Untersuchung von Meldungen an die *American Association of Poison Control Centers* von 1993–1997 zeigt, dass eine kontrollierte Anwendung von DEET als sicher angesehen werden kann [Bell et al. 2002].

DEET erfüllt die wichtigsten Eigenschaften eines Repellents (siehe Kap. 2.1.1). Als einzige Ausnahme ist die hohe Resorption zu nennen, die durch die Haut nach dem Auftragen erfolgen kann [Schepper 1999, Schmidt et al. 1959, Selim et al. 1995]. Durch spezielle DEET-Formulierungen soll bei optimaler Wirkung eine Resorption minimiert werden.

Endverbraucher kritisieren die Tatsache, dass DEET einige Kunststoffe löst und einen oft als unangenehm empfundenen Geruch hat.

Abbildung 2.1: *N,N*-Diethyl-m-toluamid (DEET)

Die Firma Bayer hat in der Produktreihe Autan das DEET inzwischen vollkommen durch den Wirkstoff *sec*-Butyl-2-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-carboxylat (KBR 3023, Bayrepel, siehe Abb. 2.2) ersetzt, der vergleichbare Eigenschaften hat [Badolo et al. 2004, Barnard et al. 2002, Constantini et al. 2004, Klun et al. 2003, Pretorius et al. 2003], jedoch etwas verträglicher ist und keine Kunststoffe löst. Trotzdem ist die Bedeutung von DEET als eines der verbreitetsten und wirksamsten Repellents unbeeinträchtigt. Derzeit wird der Wirkstoff u. a. von den *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) in den USA als Schutz gegen den *West Nile Virus*, der von Mücken übertragen wird, empfohlen [Sudakin und Trevathan 2003].

Abbildung 2.2: *sec*-Butyl-2-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-carboxylat (KBR 3023, Bayrepel)

DEET wird durch die Haut absorbiert und über den Urin wieder ausgeschieden [Schmidt et al. 1959]. Die Arbeitsgruppe Selim [Selim et al. 1995] hat ermittelt, dass 5,63 % von unverdünntem DEET bzw. 8,41 % aus 15%iger ethanolischer DEET-Lösung von Menschen absorbiert werden. Schon nach 12 h ist ein Großteil des Wirkstoffs ausgeschieden, innerhalb von 24 h hat er sogar fast vollständig den Körper verlassen. Die Ausscheidung

erfolgt hauptsächlich über den Urin in Form von verschiedenen Metaboliten. Untersuchungen des Metabolismus von DEET bei längerer Anwendung des Repellents wurden nur zum Zweck der Entwicklung von analytischen Methoden durchgeführt, zeigen aber, dass sich in diesem Fall andere Metabolite von DEET bilden als bei der einmaligen Anwendung [Sudakin und Trevathan 2003].

Im Laufe der Zeit wurden viele verschiedene Untersuchungen bezüglich der Toxizität von DEET gemacht. Der orale LD₅₀-Wert für DEET beträgt 2,1–3,7 mg/kg Körpergewicht (gemessen an Ratten). Der LD₅₀-Wert für die dermale Anwendung wurde an Kaninchen gemessen und beträgt 4,3 mg/kg [EPA 1998]. Aufgrund der Untersuchungen hat die *Environmental Protection Agency* (EPA) in den USA die Giftigkeit von DEET auf Kategorie III und IV (wenig giftig und sehr wenig giftig) festgelegt und festgestellt, dass DEET-haltige Insektenrepellents kein unangemessenes Risiko für Mensch und Umwelt darstellen. Die Daten sind in Tab. 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Giftigkeit von DEET [EPA 1998]

Modell	Resultat	Giftigkeitskategorie
LD ₅₀ bei oraler Applikation (Ratte)	2,170–3,664 mg/kg	III
LD ₅₀ bei dermaler Applikation (Kaninchen)	4,280 mg/kg	III
LD ₅₀ bei Inhalation (Ratte)	5,95 mg/l	IV
Irritation des Auges (Kaninchen)	Irritation und Korneatrübung nach 7 bzw. 3 Tagen beendet	III
Irritation der Haut (Kaninchen)	Minimale Irritation	IV
Sensibilisierung der Haut	keine	–

Wenn auch nur vereinzelt, so treten doch immer wieder Vergiftungen mit DEET auf [Clem et al. 1993, Osimitz und Grothaus 1995, Osimitz und Murphy 1997, Sudakin und Trevathan 2003]. Eine neue Beurteilung der Sicherheit von DEET durch die *Pest Management Regulatory Agency* in Kanada ergab, dass Produkte, die mehr als 30 % DEET enthalten nicht mehr zugelassen werden. Weitere Anwendungshinweise der *Agency* sind in Tab. 2.2 zusammengefasst.

Generell sollte davon abgeraten werden, Produkte mit einer Kombination von DEET und Sonnenschutz zu verwenden, da Sonnenschutz generell häufiger angewendet werden muss als Repellents. Des Weiteren kann es zu einer erhöhten DEET-Resorption durch die ungewollte Verwendung zusätzlicher *Enhancer* kommen, die sich in einem Monopräparat vermeiden lassen [Ross et al. 2004].

In der Schwangerschaft sollte DEET nur sparsam und nur bei Reisen in Gebiete eingesetzt werden, in denen die Gefahr einer Ansteckung mit Malaria besteht [CDC 2003]. Da das Risiko besteht, dass der *West Nile Virus* beim Stillen auf das Kind übertragen wird, rät das CDC gefährdeten Personen die Anwendung von DEET-haltigen Repellents während der Stillzeit [CDC 2002]. Versuche an Ratten und Kaninchen haben nur bei den Ratten und sehr hohen DEET-Konzentrationen (750 mg/kg Körpergewicht verabreicht mit einer Magensonde) Auswirkungen auf den Fötus gezeigt [Schoenig et al. 1994]. Dies Ergebnis bestätigend wird die Anwendung von DEET im zweiten und dritten Schwangerschaftsdrittel nach Untersuchungen von McGready *et al.* als sicher angesehen. Das Risiko einer Akkumulation von DEET im Fötus ist gering [McGready et al. 2001] (dennoch rät das CDC zur Vermeidung einer Anwendung bei Schwangeren soweit wie möglich).

Jüngerer Untersuchungen haben ergeben, dass wesentlich geringere Dosen an dermal appliziertem DEET in Ethanol zu neurologischen Störungen bei Ratten führen. Diese Daten widersprechen den früher ermittelten Ergebnissen für eine orale Applikation und werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die meisten oben erwähnten Daten zur Sicherheit der Anwendung von DEET werden in einem Review-Artikel von Sudakin und Trevathan zusammengefasst [Sudakin und Trevathan 2003].

2.1.3 Repellentformulierungen

Die Wahl der Formulierung hat starken Einfluss auf Wirkung und Wirkdauer von Repellentien. Dementsprechend müssen nicht nur der Wirkstoff, sondern auch die Formulierung gewisse Anforderungen erfüllen.

Tabelle 2.2: Anwendungshinweise der *Pest Management Regulatory Agency* [Health Canada 2002]

Personenkreis	DEET-Gehalt im Produkt
Erwachsene und Kinder ab 12 Jahre	bis 30 %
Kinder im Alter von 2–12 Jahren	bis 10 %, nicht öfter als 3x am Tag
Kinder im Alter von 0,5–2 Jahren	bis 10 %, nur in Fällen von hohem Risiko für das Kind durch einen Stich
Kinder unter 6 Monaten	keine Anwendung von DEET-haltigen Produkten

Zunächst müssen die Formulierungsbestandteile den gleichen Sicherheitsanforderungen genügen wie der Wirkstoff selbst. Sie sollten die Haut also nicht irritieren oder sensibilisieren, und sie sollten nicht den Durchtritt des Wirkstoffs durch die Haut fördern (Wirkung als *Enhancer*). Des Weiteren müssen sie inert gegenüber dem Wirkstoff sein.

Besonders zwei durch die Formulierung beeinflussbare Faktoren sind hervorzuheben:

- der Schutz des Körpers vor unerwünschten Nebenwirkungen
- die Wirkdauer

Eine resorptionsfördernde Wirkung des Wirkstoffträgers, wie sie z. B. bei der Anwendung von DEET gelöst in Ethanol beobachtet werden kann [Selim et al. 1995, Stineciper und Shah 1997], sollte vermieden werden. Das Eindringen des Wirkstoffs in bzw. durch die Haut kann durch eine passende Formulierung sogar im Vergleich zur reinen Substanz erheblich verringert werden. Wenn der Wirkstoff beispielsweise eine größere Affinität zur Formulierung als zur Haut hat, wird mehr vom langsam abdampfenden Wirkstoff an die Umgebung als in die Haut abgegeben.

Des Weiteren kann eine Diffusionsbarriere eingeführt werden. In Autan Family wird der Wirkstoff Bayrepel (bzw. vor dessen Markteinführung das DEET) in einer Emulsion verarbeitet. Der lipophile Stoff muss zunächst das Wasser durchdringen und kommt erst danach mit Haut bzw. Umgebungsluft in Kontakt. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass der

Einschluss des Wirkstoffs in eine disperse Phase [Domb 1993, Domb und Marlinsky 1995, Hannibal et al. 1992, Mehr et al. 1985] zur Verringerung der Absorption durch die Haut führt.

Die Verzögerung der Wirkstofffreigabe hat neben dem Schutz für den Körper den Vorteil, dass der Wirkstoff länger auf der Haut verbleibt und somit eine Verlängerung der Wirkdauer erzielt werden kann. Ein Vergleich von DEET in Lipospheres und in Ethanol kann dies belegen [Domb et al. 1996].

2.2 Stabilisierung von zweiphasigen Systemen

Bei Emulsionen und Suspensionen liegt eine Phase mehr oder weniger fein verteilt in einer anderen Phase vor. Bei Emulsionen handelt es sich um zwei nicht mischbare Flüssigkeiten, während bei einer Suspension feste Partikel in einer flüssigen Phase dispergiert sind. Die beiden Phasen werden als die disperse (oder innere) Phase und die kontinuierliche oder (äußere Phase) bezeichnet. Je feiner die Verteilung der inneren Phase, desto größer ist die Grenzfläche zwischen den Phasen. Wie in Gleichung 2.1 beschrieben, führt dies zu einem Anstieg der Grenzflächenenergie.

$$\Delta E = \gamma \cdot \Delta A \quad (2.1)$$

ΔE = Grenzflächenenergie

γ = Grenzflächenspannung

ΔA = Zunahme der Grenzfläche

Da jedes System einen möglichst energiearmen Zustand anstrebt, sind Emulsionen und Suspensionen thermodynamisch instabil.

Folgende Phänomene können bei der Lagerung von dispersen Systemen beobachtet werden:

- **Aufrahmung:** Ist die Dichte der dispersen Phase kleiner als die der kontinuierlichen, steigen die Partikel nach oben und sammeln sich im oberen Bereich des Systems. Durch die große Nähe der einzelnen Partikel wird Koaleszenz, also das Zusammenfließen der Partikel begünstigt.
- **Sedimentation:** Hat die innere Phase eine größere Dichte als die äußere, sinken die Teilchen nach unten und können dort eine feste Schicht bilden, die sich durch Aufschütteln nicht mehr dispergieren lässt (*Caking*).
- **Flockung:** Die Bildung von Aggregaten ohne Verlust der Individualität des Einzelpartikels. Geflockte Systeme sind in der Regel redispergierbar.
- **Partikelgrößenwachstum:** Durch die so genannte Ostwaldreifung kommt es ohne Kontakt der Partikel zu einem Anwachsen der großen Partikel auf Kosten von kleineren. Die kleineren Partikel verschwinden schließlich ganz.
- **Koaleszenz:** Bei Emulsionen kann es zum Zusammenfließen von zwei Partikeln kommen. Auf diese Weise nimmt die Grenzfläche und somit auch die Energie des Systems ab.
- **Versinterung:** Partikel von Suspensionen können z. B. durch Umlösungsvorgänge interpartikulär miteinander verschmelzen und auf diese Weise ihre Individualität verlieren.

Das Stokesche Gesetz (siehe Gleichung 2.2) beschreibt das Verhalten der inneren Phase in einem dispersen System. Hat die disperse Phase (ρ_2) die höhere Dichte, sedimentiert sie mit der Geschwindigkeit v , hat sie die niedrigere Dichte, rahmt sie auf.

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_1 - \rho_2) \cdot r^2 g}{\eta} \quad (2.2)$$

v = Aufrahmungs- bzw. Sedimentationsgeschwindigkeit

ρ = Dichten der beiden Phasen

r = Teilchenradius

g = Erdbeschleunigungskonstante

η = Viskosität der dispersen Phase

Aus der Formel lassen sich einige Maßnahmen zur Stabilisierung ableiten. Aufrahmung und Sedimentation kann durch den Angleich der Dichten der beiden Phasen entgegengewirkt werden. Zusätzlich können Aufrahmung und Sedimentation durch Verkleinerung der Partikel oder Vergrößerung der Viskosität des Dispersionsmediums verlangsamt werden.

In der Praxis sind diesen Methoden meist Grenzen gesetzt, weil die pharmazeutischen oder kosmetischen Anforderungen an die verwendeten Phasen eine Veränderung von Viskosität und Dichte nur in geringem Umfang zulassen. Eine Verkleinerung der Partikel bewirkt die Erhöhung der Grenzfläche und damit der Energie des Systems. Dies wirkt einer Stabilisierung entgegen. Für jedes System muss eine optimale Partikelgröße ermittelt werden, die aber auch wiederum pharmazeutischen und kosmetischen Gesichtspunkten gerecht werden muss.

Die entscheidende Stabilisierungsmethode für disperse Systeme erfolgt über die Absenkung der Grenzflächenspannung, die nach Gleichung 2.1 eine Erniedrigung der Energie und somit eine Stabilisierung zur Folge hat. Meist werden Tenside (aber auch grenzflächenaktive Polymere; siehe Kap. 2.2.1) eingesetzt, amphiphile Stoffe, die sich an der Grenzfläche anlagern. Nach Absättigung der Ober- und Grenzflächen, also bei Erreichen der so genannten kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC), bilden Tenside Mizellen.

2.2.1 Stabilisierung disperser Systeme mit Polymeren

Die IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) definiert Emulgatoren als grenzflächenaktive Substanzen, die an Grenzflächen absorbieren und die Oberflächenspannung senken. Sie erleichtern schon in geringen Konzentrationen die Emulsionsbildung und erhöhen die Stabilität, in dem sie die Aggregations- und/oder die Koaleszenzrate erniedrigen [IUPAC 1972]. Grenzflächenaktive Polymere, die die Stabilität von dispersen Systemen erhöhen, gehören somit zu den Emulgatoren.

Polymeremulgatoren sind dazu geeignet verschiedenste Systeme zu stabilisieren: Emulsionen des Typs O/W (z. B. mit Hypromellose; siehe Kap. 2.2.2), Emulsionen des Typs W/O [Melzer 2000] und sogar Nanopartikel [Westesen 1993].

Grenzflächenaktive Polymere lagern sich wie die klassischen Tenside an den Grenzflächen der Phasen an und senken auf diese Weise die Grenzflächenspannung, sie können jedoch keine Mizellen bilden. Sie haben wie Tenside hydrophile und lipophile Molekülanteile; diese sind zufällig über die Länge des Moleküls verteilt.

Die Polymermoleküle lagern sich zunächst geknäuelt an der Grenzfläche an. In diesem Stadium ragen lipophile Segmente in die hydrophile Phase und hydrophile Segmente in die lipophile Phase, was eine Umorientierung des Moleküls zur Folge hat, die je nach Beweglichkeit der Polymersegmente unterschiedliche Geschwindigkeiten erreichen kann. Die Beweglichkeit der Polymere ist immer langsamer als die von Tensiden, Polymere gehören also zu den „langsamen“ Emulgatoren. Bei Überschreiten der so genannten kritischen Aggregatbildungskonzentration (CAC; Vgl.: CMC bei klassischen Tensiden) des Polymers bilden sich Aggregate des Polymeremulgators in der Lösung.

Die Ausrichtung der Moleküle ist in Abb. 2.3 dargestellt. Die Molekülsegmente, die in der Grenzfläche verankert vorliegen, werden als *trains* bezeichnet und Molekülenden, die in eine der beiden Phasen hereinragen, als *tails*. Zwischen zwei *trains* liegende Molekülschlaufen, die in eine der beiden Phasen ragen, werden *loops* genannt [Friberg 1976].

Liegt ein lückenloser Grenzflächenfilm vor, kann einer Annäherung der Partikel entgegen gewirkt und somit die Emulsion bzw. Suspension stabilisiert werden. Voraussetzung hierfür

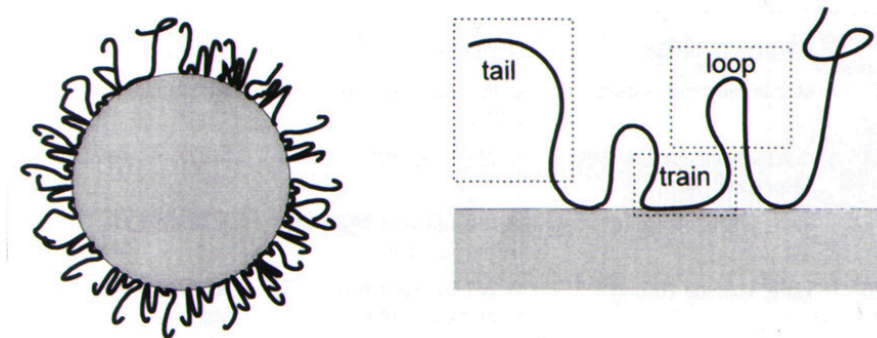


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Anordnung eines Polymermoleküls an der Grenzfläche [Daniels 2004]

ist eine ausreichende Verankerung der Moleküle an der Grenzfläche, zusätzlich zu einer ausreichend dicken und hydratisierten Polymerschicht [Hunter 1986].

Die Stabilisierung beruht auf zwei Prinzipien: Nähern sich zwei Partikel weit genug aneinander an, dass sich die beiden Polymerfilme durchdringen, kommt es zu einer Erhöhung der Polymerkonzentration im Überlappungsbereich und somit zu einer lokalen Erhöhung des osmotischen Drucks. Sind die oben genannten Voraussetzungen erfüllt, kann das Polymer nicht ausweichen und der Erhöhung des osmotischen Drucks kann nur mit dem Auseinanderweichen der Partikel entgegengewirkt werden. Bei diesem Effekt handelt es sich um die Enthalpiestabilisierung, die abhängig von der Hydratation der Polymerschicht und der Konzentration des Polymers in der Grenzfläche ist [Hunter 1986].

Nähern sich zwei Partikel so weit an, dass die Polymerschicht eines Partikels die Oberfläche eines anderen berührt, führt dies durch Kompression und Deformation der Polymermoleküle zur Erhöhung der Ordnung. Dieser entropische Anteil der sterischen Stabilisierung sorgt ebenfalls für eine Vergrößerung der Entfernung zwischen den Partikeln.

Sind die oben genannten Bedingungen nicht erfüllt, kann das Polymer das System nicht ausreichend stabilisieren. Die Polymersegmente können in diesem Fall seitlich ausweichen, es kann zu Brückenbildung zwischen zwei Partikeln kommen oder zur Desorption. Die Folge ist Agglomeration der Partikel, die schließlich zu Koaleszens oder Versinterung führen kann.

Eine Erhöhung der Polymerkonzentration über die minimal erforderliche Menge hinaus bewirkt wie bei herkömmlichen Tensiden eine zusätzliche Stabilisierung [Vuleta et al. 1997], die durch die Viskositätserhöhung des Dispersionsmediums sowie die Vergrößerung der Polymerschicht um die Partikel zu Stande kommt.

Die Viskositätserhöhung durch den Zusatz einer Polymerlösung zu einer Suspension oder Emulsion bedingt eine weitere Verbesserung der Stabilität (siehe Gleichung 2.2). Bei Verwendung der nicht grenzflächenaktiven Polyacrylsäure als Polymer wird beispielsweise die Stabilisierung fast ausschließlich über die Fließgrenze des Dispersionsmediums erreicht [Daniels 2002].

Die Stabilisierung mit Polymeren hat sich bei der Herstellung von Topika als vorteilhaft erwiesen, weil die Moleküle aufgrund der hohen Molekülmasse nicht durch das Stratum corneum penetrieren können, was ihnen bei topischer Anwendung ein wesentlich geringeres Irritationspotential im Vergleich zu vielen klassischen Tensiden gibt [Daniels 2001].

2.2.2 Hypromellose als Polymeremulgator

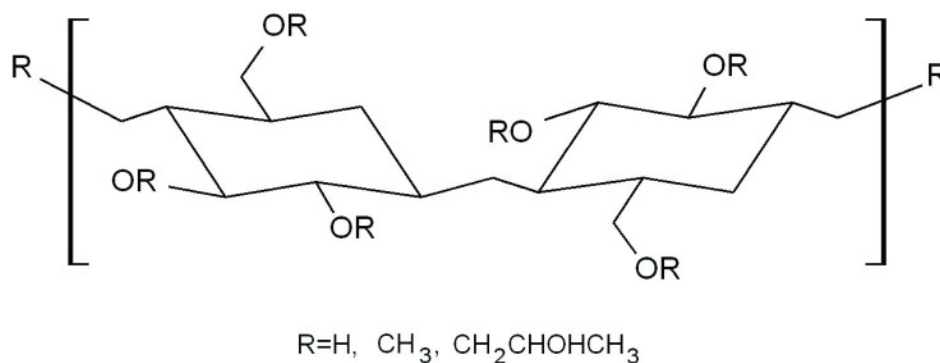


Abbildung 2.4: Hypromellose

Hypromellose (Hydroxypropylmethylcellulose, HPMC; siehe Abb. 2.4) hat sich in früheren Arbeiten als geeignet erwiesen O/W-Emulsionen mit verschiedenen lipophilen Phasen zu stabilisieren [Daniels und Barta 1991, Kawaguchi und Kubota 2004, Schepper 1999, Wollenweber et al. 2000]. Erfolgt die Herstellung nach dem Rotor-Stator-Prinzip (z. B. mit einem Ultra Turrax), liegen die Partikelgrößen der Emulsionen im Bereich von 2–5 μm

[Daniels 2002]. Erfolgt der Energieeintrag über eine Hochdruckhomogenisation sind sogar Partikelgrößen von unter 1 μm stabilisierbar [Schulz und Daniels 2000]. HPMC-stabilisierte Emulsionen sind auch nach Hitzesterilisation noch stabil [Daniels und Rimpler 1993].

2.3 Die Haut

Da DEET über die Haut resorbiert werden und so zu unerwünschten Nebenwirkungen bei der Anwendungen führen kann, wird im Folgenden auf den Aufbau und die Resorptionswege der Haut eingegangen.

Die Haut (siehe Abb. 2.5) ist das größte Organ des Menschen und hat direkten Kontakt zur Umwelt. Sie kann mechanische, thermische und Kontaktreize wahrnehmen und steuert die Wärmeregulation des Körpers durch Schweißabsonderung und Steuerung des transepidermalen Wasserverlustes durch Verengung und Erweiterung der Gefäße. Als Barriere zwischen Körper und Umwelt erfüllt sie eine Vielzahl von Schutzfunktionen gegen mechanische, chemische und mikrobiologische Einwirkungen und durch eingelagertes Melanin gegen schädliche UV-Strahlen. Der transepidermale Wasserverlust ist ein Maß für die Permeabilität der Haut [Rougier et al. 1987]. Dies erklärt, warum ein hoher transepidermaler Wasserverlust die Schutzzeit von DEET verringert [Rietschel und Spencer 1975].

Die Haut besteht aus drei Schichten: Die Subkutis, die unterste Gewebeschicht, besteht aus lockerem Bindegewebe und geht ohne scharfen Übergang in die Dermis über. In der Dermis (auch Korium genannt) sind Hautanhangsgebilde wie Haare und Schweißdrüsen verankert. Sie gibt der Haut strukturelle Festigkeit. Die Epidermis bildet die oberste Schicht der Haut und ist die wichtigste Barriere gegenüber der Umwelt. Bei der Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel mit hoher Zellteilungsrate. Sie ist ein holokrines Organ ohne Blutgefäße, das über die Dermis versorgt wird.

Im Wesentlichen ist die Epidermis in vier Schichten aufgebaut (siehe Abb. 2.6). Das Stratum basale (Basalzellschicht) bildet die unterste Schicht und besteht aus einer einzelnen Zellschicht. Ungefähr 1 % der Zellen ist mitotisch aktiv. Die hier gebildeten Keratinozyten

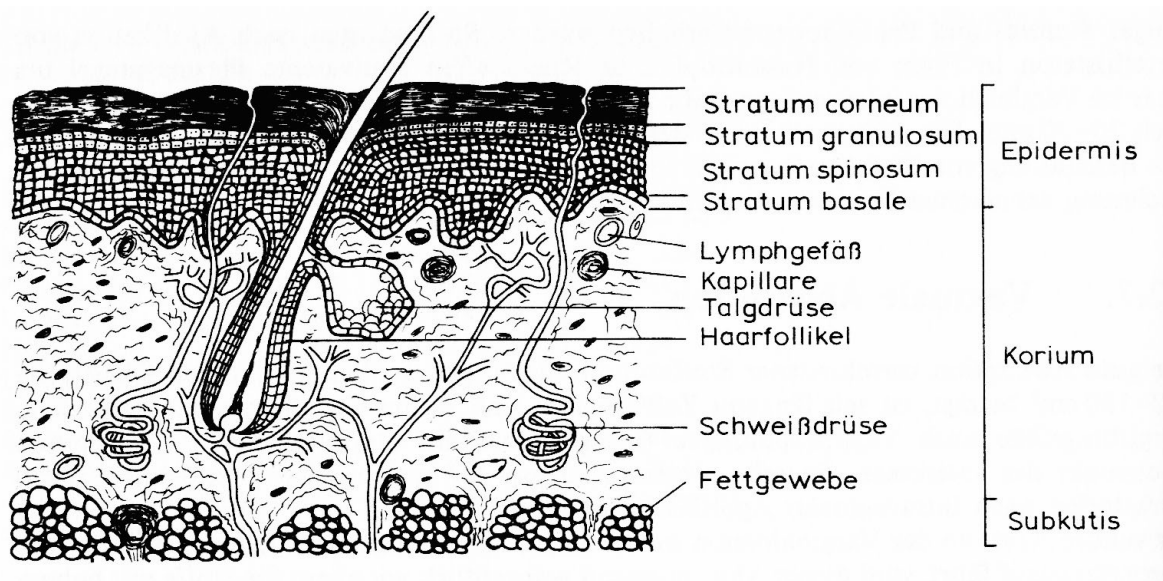


Abbildung 2.5: Aufbau der menschlichen Haut aus [Pfeifer et al. 1984].

erfahren auf ihrem Weg nach außen eine weitere Differenzierung, die die jeweiligen Schichten der Epidermis charakterisiert und mit dem Zelltod der Keratinozyten endet.

Dem Stratum basale aufgelagert sind die 2–5 Zellschichten des Stratum spinosum (Stachelzellschicht). Hier finden erste Differenzierungsprozesse statt. Darüber befinden sich die 1–3 Zellschichten des Stratum granulosum, in dem die endgültige Differenzierung und der Zelltod der Keratinozyten stattfindet. Nach dem Zelltod, Keratinisierung und vollständiger Auflösung der Zellorganellen werden die Keratinozyten als Korneozyten bezeichnet. Die äußerste Schicht ist das aus abgestorbenen verhornten Zellen bestehende Stratum corneum (Hornschicht).

Das Stratum corneum (Hornschicht, siehe Abb. 2.7) ist ca. $10\ \mu\text{m}$ dick und besteht je nach Körperregion aus 15–25 Zellschichten. An der Fußsohle können es bis zu 100 Zellschichten sein. Es ist reißfest und fast vollständig undurchlässig. Die Korneozyten sind backsteinartig angeordnet und werden von einer interzellulären Lipidschicht zusammengehalten. Der Aufbau wird im Allgemeinen mit einem „Backstein-und-Mörtel-Modell“ verglichen, wobei die abgeflachten Korneozyten die Backsteine und der Lipidmantel den Mörtel darstellen (siehe Abb. 2.7) [Elias et al. 1979]. Bei dem Lipidmantel handelt es sich um eine kohärente

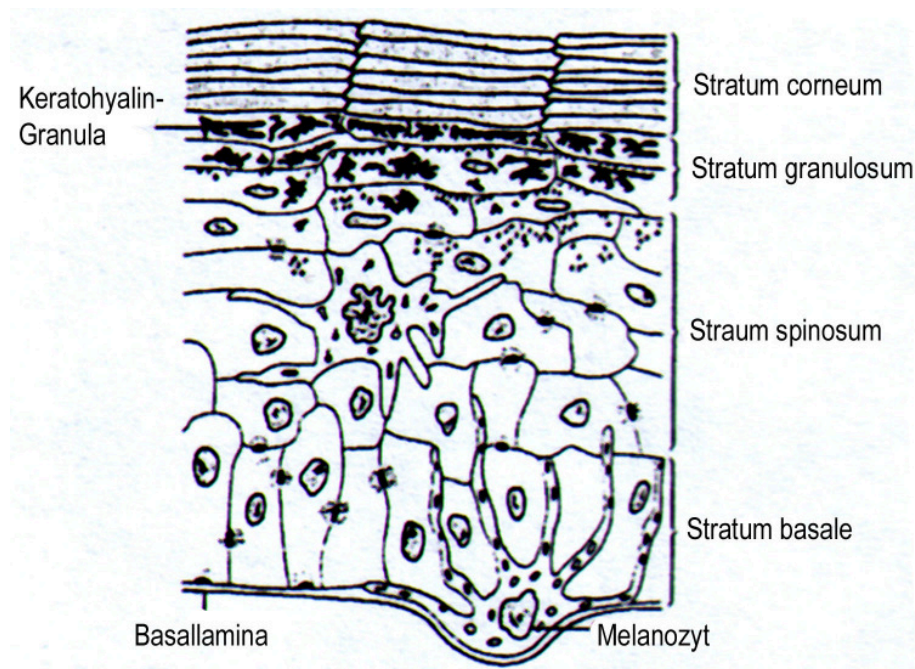


Abbildung 2.6: Aufbau der Epidermis aus [Fritsch 1985].

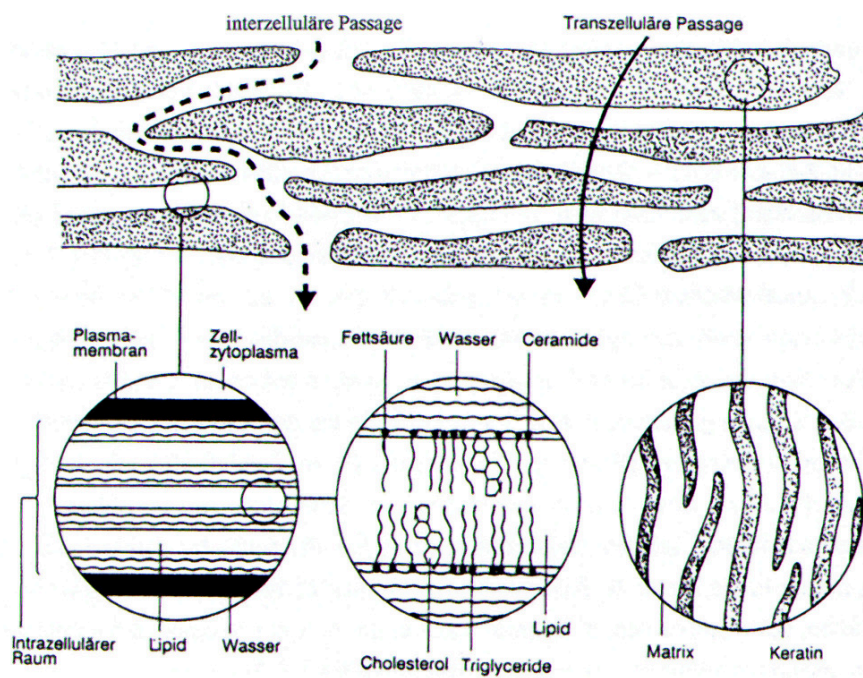


Abbildung 2.7: Stratum corneum („Backstein und Mörtel“-Modell nach [Barry 1987])

lamellare Lipid-Doppelschicht. Sie besteht aus Cholesterol, Cholesterolestern, Ceramiden und Fettsäuren. Trotz der Ähnlichkeit zur Zellmembran sind die Barriereigenschaften ausgeprägter als bei Biomembranen. Dieses kommt eventuell von einem veränderten Aufbau. Von Bouwstra *et al.* [Bouwstra et al. 1992] wird statt des rein flüssigkristallinen Aufbaus der Membranen ein Gelzustand mit orthorombisch und hexagonaler Anordnung der Lipidketten für die Lipidschicht beschrieben, welcher die Barriereigenschaften sicherlich günstig beeinflusst. Die Bedeutung der Lipidschicht für die Barrierefunktion kann daran erkannt werden, dass eine Extraktion der Lipide aus dem Stratum corneum (z. B. mit organischen Lösungsmitteln), zu einem starken Anstieg der Permeabilität führt [Smith et al. 1982].

2.4 Dermale Resorption

Bei dermalen Applikation von Arznei- oder kosmetisch wirksamen Stoffen, muss außer der lokalen Wirkung auch die Resorption des Stoffs durch die Haut in Betracht gezogen werden. Da DEET teilweise in hohen Konzentrationen angewendet wird und zu schädigenden Nebenwirkungen führen kann, muss eine Penetration möglichst verhindert werden. Zusätzlich steht resorbiertes DEET für eine repellierende Wirkung nicht mehr zur Verfügung, was die Wirkdauer verringert.

Abb. 2.7 zeigt die verschiedenen Resorptionswege durch das Stratum corneum der Haut. Penetration findet immer als passive Diffusion entlang von Konzentrationsgefällen statt. Die interzelluläre Diffusion ist die häufigste Art der Wirkstoffdiffusion in tiefere Schichten der Haut. Der Stoff diffundiert durch die lamellare Lipidschicht zwischen den Korneozyten, wobei er ihre hochstrukturierten Lipide durchqueren muss. Der transzelluläre Weg, also die direkte Diffusion durch die Korneozyten entlang der Keratinfilamente und durch die Stratum-corneum-Lipide, ist für einige hydrophile Stoffe der bevorzugte Weg. Lipophile Stoffe diffundieren zunehmend auf interzellulärem Weg durch das Stratum corneum [Niedner und Ziegenmeyer 1992]. Entlang von Hautanhangsgebilden wie Schweißdrüsen, Haarfollikel und Talgdrüsen ist die Penetration von dermal applizierten Stoffen erleichtert.

Die Resorption wird neben dem Applikationsort von verschiedenen weiteren Faktoren beeinflusst.

Physiologische Faktoren (zusammengefasst in [Idson 1975]):

- Alter
- Hautregion
- Zustand und Hydratationsgrad der Haut

Physikochemische Faktoren [Niedner und Ziegenmeyer 1992]:

- Aktivität des dermal aufgetragenen Stoffs
- Wechselwirkungen zwischen Haut und penetrierendem Stoff
- Wechselwirkungen zwischen Haut und anderen anwesenden Stoffen, z. B. dem Vehikel eines dermal applizierten Arzneistoffs. Dazu gehört auch die Anwesenheit von *Enhancern*.
- Freisetzung des Stoffs aus dem Vehikel

Im Gegensatz zu den physiologischen können die physikochemischen Faktoren teilweise beeinflusst werden. Die Konzentration des dermal aufgetragenen Stoffs ist im Falle des DEET mit bis zu 30 % relativ hoch. Um die resorbierte Menge zu minimieren, sollte eine möglichst geringe Konzentration appliziert werden. Die *Pest Management Regulatory Agency* in Kanada hat die Konzentration von DEET bei der Anwendung an Kindern auf 10 % beschränkt (siehe Tab. 2.2).

Die Wechselwirkungen zwischen Haut und Wirkstoff sind stark abhängig vom Verteilungsgrad des Wirkstoffs zwischen Vehikel und Keratin oder Stratum corneum. Als Berechnungsgrundlage wird häufig der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient herangezogen [Hagedorn-Lewecke 1995, Potts und Guy 1992, Potts und Guy 1993]. Der logarithmische Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von DEET ist mit 3 relativ hoch, was eine höhere Affinität zu den Stratum-corneum-Lipiden als zum wässrigen Vehikel repräsentiert. Dementsprechend überrascht nicht, dass verschiedene Autoren eine gute Penetration von DEET durch die Haut nachweisen konnten [Blomquist und Thorsell 1977, Feldmann und

Maibach 1970, Moody et al. 1989, Moody und Nadeau 1993, Reifenrath et al. 1991, Schmidt et al. 1959, Schoenig et al. 1996, Snodgras und Johnson 1982] und für DEET sogar eine resorptionsverbessernde Wirkung beschrieben wurde [Zatz 1994]. Da es sich bei Repellentien allgemein um hochsiedende, lipophile Stoffe mit einem hohen Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten handelt, muss generell mit einer hohen Hautpenetration gerechnet werden. Eine Applikation des Wirkstoffs in einem dispersen System wirkt diesem Umstand entgegen. Die hohe Affinität zur lipophilen dispersen Phase sorgt für eine langsamere Freisetzung und damit zu einer verringerten Hautpenetration (siehe Abb. 2.8).

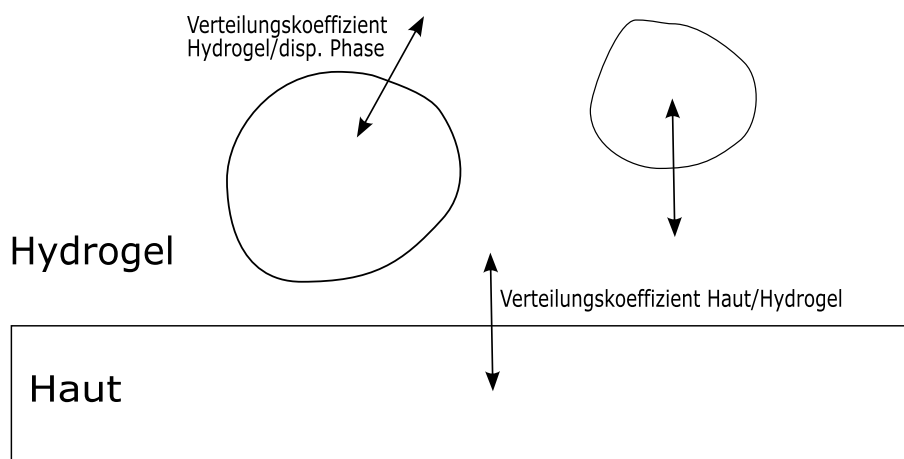


Abbildung 2.8: Einfluss der Verteilungskoeffizienten eines Wirkstoffs in polymerstabilisierten dispersen Systemen auf die Hautpenetration

Sowohl die hohe Anwendungskonzentration als auch die Eigenschaften des DEET sorgen für eine hohe Penetrationsrate. Da Repellents aber großflächig und wiederholt angewendet werden, muss eine Formulierung gewählt werden, die einer Penetration entgegen wirkt. Auf Stoffe, die auf eine Weise mit der Haut in Wechselwirkung treten, dass sie eine Penetration begünstigen – die so genannten *Enhancer* – sollte nach Möglichkeit verzichtet werden.

Schon Wasser hat durch eine verstärkte Hydratation des Stratum corneum eine resorptionsverbessernde Wirkung [Ashton et al. 1986, Idson 1975, Neubert et al. 1996, Zatz 1994, Ziegenmeyer 1986]. Für DEET wurde nachgewiesen, dass eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit, welche eine erhöhte Hydratation der Haut zur Folge hat, die Permeation verbessert

[Hawkins und Reifenrath 1984]. Auf Wasser kann aus kosmetischen Gründen (Hautgefühl, fettiger Hauttyp, ...) allerdings in den wenigsten Rezepturen vollkommen verzichtet werden.

Wird DEET in disperse O/W-Systeme eingearbeitet, dient das Wasser als Diffusionsbarriere, die eine Freisetzung und damit auch die Resorption verringert, da die Freisetzung geringer ist je schlechter sich der Stoff in der äußeren Phase löst (siehe Abb.2.8) [Neubert et al. 1996]. Die resorptionsverbessernde Wirkung kann daher in diesem Fall vernachlässigt werden.

Auch andere Lösungsmittel können penetrationsfördernde Wirkung aufweisen. Besonders die in den Anfangszeiten der Anwendung von DEET häufig als Lösungsmittel benutzten Alkohole Ethanol und Isopropanol sind als *Enhancer* bekannt. Hervorgerufen wird diese Wirkung durch ein Herauslösen der Lipide aus dem Stratum corneum und zusätzlich durch das Eindringen der Alkohole in die oberste Hautschicht, wo sie die Löslichkeit von anderen Stoffen verbessern [Berner et al. 1989]. Aus diesem Grund wird in vielen modernen Repellentienformulierungen auf Alkohole als Lösungsmittel verzichtet.

2.5 Arzneimittelfreisetzung aus Dermatika

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus dermalen Systemen geschieht durch passive Diffusion, die durch das Ficksche Gesetz (siehe Gl. 2.3) beschrieben wird.

$$\frac{dm}{dt} = -q \cdot D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (2.3)$$

$\frac{dm}{dt}$ = Massenfluss

q = Diffusionsquerschnitt

D = Diffusionskoeffizient

$\frac{dc}{dx}$ = Konzentrationsgradient

Wechselwirkungen zwischen Vehikel und Repellent verlangsamen die Freisetzung. In diesem Fall wird ein scheinbarer Verteilungskoeffizient nach Higuchi [Higuchi 1967] berechnet.

$$Q = 2 \cdot A \cdot C_0 \sqrt{\frac{D_s \cdot t}{\pi}} \quad (2.4)$$

Q = kumulativ Menge des freigesetzten Arzneistoffs [mg]

A = Diffusionsquerschnitt [cm^2]

C_0 = Anfangskonzentration [$\frac{\text{mg}}{\text{cm}^3}$]

D_s = scheinbarer Diffusionskoeffizient [$\frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$]

t = Zeit [s]

In *in-vitro*-Freisetzungsversuchen hat sich gezeigt, dass die Menge des Donators [Corbo et al. 1993] und die Temperatur die Freisetzung beeinflussen. Bei zweiphasigen halbfesten Systemen kommen weitere Faktoren hinzu: Die Verteilung des Arzneistoffs zwischen den Phasen, die Viskosität und die Partikelgröße.

Ist ein Arzneistoff in eine Suspension eingearbeitet (z. B. das in dieser Arbeit untersuchte DEET in eine Suspension mit einer Suppositoriengrundlage als disperser Phase) kommt der Temperatur bei Freisetzungsbetrachtungen eine besondere Rolle zu. Da sie den Kristallisationsgrad beeinflusst, greift sie an zwei Stellen in das Freisetzungsverhalten ein.

Für Hartfette wird statt eines Schmelzpunktes ein *Solid-Fat-Index* angegeben [Müller et al. 1986], da sich durch die heterogene Zusammensetzung in einem großen Temperaturbereich noch Teile des Fettes in flüssigem Zustand befinden. Das Diffusionsverhalten des Wirkstoffs innerhalb des Lipids und damit die Freisetzung aus dem dispersen System wird stark davon beeinflusst, wie viel des Fettes kristallisiert ist. Zusätzlich kommt der normale Einfluss der Temperatur zum Tragen.

Wird ein Polymeremulgator eingesetzt, wie es in dieser Arbeit der Fall ist, beeinflusst dessen Konzentration über den Einfluss auf die Viskosität die Freisetzung. Des Weiteren dient der „Polymerfilm“ (ein hochkonzentriertes Hydrogel) um die Teilchen als Diffusionsbarriere, die die Freisetzung weiterhin verlangsamt. Je höher die Polymerkonzentration, desto dicker ist dieser Polymerfilm.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Insektenrepellent

***N,N*-Diethyl-*m*-toluamid** (DEET, M_r 191,3) ist ein Amid der 3-Methyl-benzoesäure, welches bei Raumtemperatur langsam verdampft und eine repellierende Wirkung gegen eine große Anzahl von Fluginsekten und Zecken besitzt. Es wurde in USP-Qualität von der Firma KVP Pharma- und Veterinärprodukte (D-Kiel) zur Verfügung gestellt (Charge: VA0262). Die Substanz ist löslich in Alkoholen und nicht löslich in Paraffin. Oberhalb des Schmelzpunktes des Gemisches ist DEET mit den verwendeten Fetten (Suppocire C, Suppocire NA50 und Suppocire AM) vollständig mischbar. Der Siedepunkt beträgt bei Normaldruck 240 °C. Die Wasserlöslichkeit ist mit 0,2 % bzw. 1,4 % angegeben, der logarithmische Oktanol/Wasserverteilungskoeffizient mit 3 [Hagedorn-Lewecke 1995]. Die Dichte beträgt $0,9990 \frac{g}{cm^3}$.

3.1.2 Lipidphase der Suspension

Suppocire AM, Suppocire C und Suppocire NA50 sind halbsynthetische Glyceridgemische. Suppocire AM besteht aus Mono-, Di- und Triglyceriden gesättigter Fettsäuren der Kettenlänge C₁₂–C₁₈, die beiden anderen Hartfette aus entsprechenden Glyceriden gesättigter und ungesättigter Fettsäuren der gleichen Kettenlänge. Die Menge an unverseifbaren Anteilen beläuft sich bei allen drei Fetten auf unter 0,6 %. Die Lipide wurden von der Firma Gattefossé (D-Weil am Rhein) in einer Qualität entsprechend der Monographie Hartfett im EuAB 2001 zur Verfügung gestellt (Suppocire AM: Charge 8E3106-2, Suppocire C: Charge 7E4906-2, Suppocire NA50: Charge 8E4504-2).

Fettkennzahlen und Schmelzbereiche aller Hartfette sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen. Oberhalb des Schmelzpunktes sind alle drei Lipide mit DEET vollständig mischbar.

Tabelle 3.1: Eigenschaften der Hartfette Suppocire AM, C und NA50 (Herstellerangaben)

	Suppocire AM	Suppocire C	Suppocire NA50
Säurezahl [mg KOH/g]	< 0,20	< 0,50	< 0,50
Iodzahl [g I ₂ /100 g]	< 2	< 2	< 2
Verseifungszahl [mg KOH/g]	228–252	218–242	218–242
Hydroxylzahl [mg KOH/g]	< 10	20–30	38–48
Schmelzbereich [°C] (Tropfpunkt)	35,0–36,5	38,0–40,0	34,5–36,5

3.1.3 Stabilisatoren

Hypromellose: Im Rahmen der Arbeit wurden zwei verschiedene Hypromellosen eingesetzt, die beide von der Firma Shin-Etsu (J-Tokyo) in USP-Qualität zur Verfügung gestellt wurden.

- Metolose 90 SH 100 (Charge: 206314): Die Substanz entspricht dem Substitutionstyp 2208 und weist einen prozentualen Methoxylgehalt von 23,0 % und einen Hydroxypropylgehalt von 5,9 % auf. Die Viskosität einer 2%igen Lösung beträgt nach Herstellerangaben 117 mPas.

- Metolose 90 SH 4000 (Charge: 508822): Der prozentuale Methoxylgehalt beträgt laut Spezifizierung 19–24 %, der Hydroxypropylgehalt 4–12 % (Substitutionstyp 2208). Die Viskosität einer 2%igen Lösung beträgt laut Spezifikation 3000–5600 mPas.

Lecithin: Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das Phospholipon 90G der Firma Phospholipid AG (D-Köln) verwendet. Laut Herstellerangaben handelt es sich bei der gelben, wachsartigen Substanz um hochgereinigtes angereichertes Sojalecithin mit einem Phosphatidylcholin-Gehalt von 93 ± 3 %.

Sorbitanstearat: Hierbei handelt es sich um SPAN 60. Der Emulgator wurde von der Firma ICI Surfactants (GB-Cleveland) bezogen.

3.1.4 Wasser

wurde in demineralisierter Qualität eingesetzt (Aqua dem.). Wasser in bidestillierter Form (Aqua dest.) kam für die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) zur Anwendung.

3.1.5 Zusätze

Polyethylenglycol 400 (PEG 400) wurde von der Firma BASF (D-Ludwigshafen) bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Suspensionen

Die Suspensionen wurden in Ansätzen zu je 75 g hergestellt. In Anlehnung an die Dissertation von K. Schepper [Schepper 1999] wurden alle Bestandteile der Zubereitung (siehe

Tab. 3.2) in ein 100-ml-Weithalsglas aus Braunglas eingewogen. Die Probe wurde für 2–3 h bei ca. 60 °C im Trockenschrank temperiert. Anschließend wurde das flüssige, warme Gemisch 5 min bei 16000 U/min mit einem Ultra Turrax T25 Basic (IKA Labortechnik, D-Staufen), dessen Dispergierwerkzeug S 25 N-18G (IKA Labortechnik, D-Staufen) kurz in siedendem Wasser angewärmt wurde, emulgiert. Das Glas wurde sofort verschlossen und bei 20 °C gelagert.

Die benötigte Hypromellose-Lösung wurde frisch hergestellt. Zu diesem Zweck wurde das Pulver abgewogen, mit siedendem Wasser (ca. zwei Drittel der insgesamt benötigten Menge) übergossen und mit einem Glasstab dispergiert. Anschließend wurde mit kaltem Wasser aufgefüllt, um eine ungefähre Temperatur von 80 °C zu erreichen, bei welcher sich die Substanz optimal dispergieren lässt, und erneut mit dem Glasstab umgerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde verdunstetes Wasser ergänzt und die Lösung sofort zur Herstellung der Suspensionen eingesetzt. Für alle Ansätze wurde eine 5%ige Stammlösung zur weiteren Verarbeitung hergestellt.

Tabelle 3.2: Konzentrationsbereich der Bestandteile der Suspensionen. Alle Suspensionen wurden mit 0,005 % Thiomersal konserviert.

Substanz	Konzentration [%]
Lipid	20
DEET	0–10
Hypromellose	0,5–3
Aqua dem.	ad 100

3.2.2 Herstellung von Lipid-DEET-Gemischen

DEET und das zu untersuchende Hartfett (siehe Kap. 3.1.2) wurden eingewogen und die Mischung geschmolzen. Anschließend wurde das flüssige Gemisch mit einem Glasstab bis zur Homogenität gerührt. Die homogene Mischung wurde in flüssigem Zustand weiterverarbeitet.

3.2.3 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Für die Ermittlung des Hartfett/Wasser-Verteilungskoeffizienten wurde der Wirkstoff DEET mit Hilfe der HPLC quantitativ bestimmt. Die Untersuchung wurde mit einem HPLC-System der Firma Waters (D-Eschborn) durchgeführt, das aus einem Pumpensystem 515, einem Autosampler 717 und einem UV-Detektor 486 bestand. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte computergestützt mit einer Waters Millenium 32 Chromatography Manager Software (Waters).

Mobile Phase: 60 Teile Methanol p.a. und 40 Teile Aqua dest. (V/V). Stationäre Phase: Reversed Phase Säule (125 x 4 mm) und Vorsäule (10 x 4 mm) mit Hypersil ODS 5 μm (Grom, D-Herrenberg). Flussrate: 1 ml/min. Detektion bei 245 nm. Mehrpunktkalibrierung ($r^2 > 0,9999$).

3.2.4 Bestimmung des Hartfett/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Zum Zweck der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von DEET zwischen den Hartfetten und Wasser wurden die Substanzen (siehe Tab. 3.3) eingewogen, für ungefähr 2 h bei ca. 55 °C in einem fest verschlossenen Gefäß im Trockenschrank gelagert, bis das Hartfett geschmolzen war, und anschließend für ca. 30 s mit dem Ultra Turrax gemischt (16000 U/min entsprechend der normalen Suspensionsherstellung). Die entstandene Emulsion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gelagert, was eine Kristallisation des Fettes zur Folge hatte. Die Suspension wurde filtriert und der DEET-Gehalt in der Wasserphase mit Hilfe der HPLC (siehe Kap. 3.2.3) bestimmt. Die Menge an DEET, die bei der Filtration dem System entzogen wurde, war vernachlässigbar gering.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Mischungen zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Substanz	Konzentration [%]
Hartfett (Suppocire C, AM oder NA50)	20
DEET	1-3
Aqua dest.	ad 100

3.2.5 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Verschiedene Lipid-DEET-Mischungen wurden mit Hilfe der DSC untersucht. Zu diesem Zweck wurden ca. 5 mg Substanz genau abgewogen und in kalt verschweißten Aluminiumtiegel gegen mit Luft gefüllte Referenztiegel vermessen (Temperaturprogramme: siehe Tab. 3.4). Folgende DSC-Anlagen fanden Verwendung: DSC 220C und DSC 120C (im Folgenden als DSC220 und DSC120 bezeichnet), jeweils mit einer Diskstation SSC 5200 H (Seiko, J-Tokyo). Die Einwaagen betrugen zwischen 5 und 8 mg. Die Kalibrierung erfolgte mit Indium und Zinn.

Tabelle 3.4: Temperaturprogramme für DSC-Untersuchungen

	Temperaturbereich	Aufheizrate	Abkühlrate
DSC120	-10–70 °C	5 °C/min	10 °C/min
DSC220	-5–60 °C	5 °C/min	10 °C/min

3.2.6 Mikroskopie/Polarisationsmikroskopie

(Polarisations-) Mikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Photomikroskop II (Zeiss, D-Oberkochen) mit einer Vergrößerung von 100 bzw. 400 durchgeführt und mit einer Olympus DP12 Digitalkamera (D-Hamburg) dokumentiert. Eine Bestimmung der Teilchengröße erfolgte mit Hilfe der AnalySIS Software (Olympus DP-Soft) der Firma Olympus (D-Hamburg). Die Polarisation wurde durch zwei Polarisationsfilter erreicht, die in einem 90°-Winkel zueinander vor und hinter der Probe im Strahlengang lagen. Das Mikroskop verfügte über ein λ -Plättchen.

3.2.6.1 Untersuchung der Suspensionen

Für Untersuchungen der unverdünnten Suspensionen wurde das disperse System vorsichtig mit einem Glasstab umgerührt und ein Tropfen mit Hilfe des Glasstabs auf den Objektträger gebracht. Um die notwendige Transparenz der Probe zu erhalten wurde ein Deckgläschen vorsichtig aufgedrückt.

Verdünnte Suspensionen wurden auf gleiche Weise auf den Objektträger aufgebracht. Ein Tropfen der Suspension wurde zu diesem Zweck in einigen Millilitern Aqua dem. mit einem Glasstab dispergiert. Ein Deckgläschen wurde vorsichtig aufgelegt.

Wenn eine Beschädigung der Teilchen durch die Probenpräparation nicht auszuschließen war, wurde die Untersuchung (entweder verdünnt oder unverdünnt) wiederholt.

3.2.6.2 Untersuchung des Lipid-Fett-Gemisches

Ein Tropfen der Mischung wurde auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Das Deckgläschen wurde leicht angedrückt, um eine ausreichende Transparenz der Probe zu gewährleisten.

3.2.6.3 Untersuchung des Abkühlvorgangs

Die frisch hergestellte Probe wurde auf den vortemperierten Objektträger aufgebracht (siehe Kap. 3.2.6.1) und mit einer Rate von 2 °C/min (Starttemp.: 40 °C; Endtemp.: 10 °C) mit einem Heiztisch Thermosystem FP900 der Firma Mettler-Toledo GmbH (D-Giessen) abgekühlt. Die Probe wurde während des Abkühlvorgangs beobachtet.

3.2.7 PIDS

Teilchengrößenuntersuchungen wurden an einem LS 13 320 *Particle Size Analyzer* der Firma Beckman Coulter (D-Krefeld) durchgeführt. Ein Tropfen, der vorsichtig mit einem Glasstab umgerührten Suspension wurde in wenigen Millilitern Aqua dem. dispergiert. Anschließend wurden die stark zur Agglomeration neigenden Teilchen mit einer Pasteurpipette auf- und abpipettiert, bis die verdünnte Suspension makroskopische Homogenität erreicht hatte. Die Messung erfolgte bei 30 % Pumpengeschwindigkeit. Jede Messung wurde drei Mal durchgeführt, wobei Messungen, die eindeutig als Ausreißer zu erkennen waren, wiederholt wurden. Insgesamt wurde die Messung maximal sechsmal durchgeführt.

Sollten nach sechs Messungen mehr als drei Ausreißer vorgelegen haben, dann wurden alle Ergebnisse gemittelt.

Bei den Untersuchungen kam es teilweise zur Ausbildung eines kleinen Peaks bei ca. $1\text{--}2\ \mu\text{m}$ (s. u.). Das Phänomen einer bimodalen Verteilung mit einem Peak in einer vergleichbaren Größenordnung trat auch bei anderen Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe auf. Bei allen Versuchen wurde Metolose 100 verwendet. In vielen Fällen war der Peak unabhängig von der Konzentration des verwendeten Lipids wie auch von der Metolose-Konzentration. Ein Wechsel des Emulgators bewirkte das Verschwinden des Peaks. Da die Scherkräfte von einem Ultra-Turrax normalerweise nicht ausreichen, um Partikel in diesem Größenbereich herzustellen und da die kleinen Partikel bei der Verwendung von Suppocire C (siehe Kap. 4.4.7) nicht mit dem Mikroskop zu erkennen sind, wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die Partikel nicht zur Suspension gehören und werden ignoriert. Im Folgenden werden nur die relevanten Ausschnitte der Kurven präsentiert.

3.2.8 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Herstellung der Replika durch Gefrierbruch: Die Probe wurde zwischen zwei Goldträgern fixiert und in schmelzendem Stickstoff mit einer Temperatur von 63 K schockgefroren. Auf diese Weise kann eine Temperaturerniedrigung von mehr als 10000 K/s gesichert werden, wodurch die Struktur der Probe erhalten bleibt. Anschließend wurde die Probe bei sehr niedrigem Druck (0,05 Pa) in der Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers GmbH, D-Wiesbaden) bei einer Temperatur von 173 K gebrochen.

Herstellung der Replika durch Gefrierschnitt: Die Probe wurde auf einen Probenteller aus Gold gegeben und in schmelzendem Stickstoff mit einer Temperatur von 63 K schockgefroren (siehe Gefrierbruch). Anschließend wurden die oberen Schichten des gefrorenen Tropfens mit einem Messer nach und nach abgehobelt, bis ungefähr die Mitte des Tropfens freigelegt war (in der Gefrierbruchätzanlage BAF 400, Temp.: 173 K, Druck: 0.05 Pa; geätzt wurde nicht).

Nach der Probenpräparation wurde in beiden Fällen die Bruch- bzw. Schnittfläche mit einem Kohlenstoff-Platin-Gemisch beschattet (45°-Winkel, 2 nm Schichtdicke) und anschließend mit Kohlenstoff bedampft (90°-Winkel, 20 nm Schichtdicke). Anschließend wurden die Replika abgelöst und gereinigt. Genauere Angaben zur Probenpräparation findet man bei Müller-Goymann [Müller-Goymann 1999]. Zur Betrachtung wurde ein Transmissionselektronenmikroskop Leo 922 (TEM, Leo, D-Oberkochen) benutzt. Die Beschleunigungsspannung betrug 120 kV.

3.2.9 NMR-Spektrometrie

Lipid-DEET-Gemische unterschiedlicher Konzentrationen wurden hergestellt. Die Substanzen wurden abgewogen und ca. 2 h bei 60 °C im Trockenschrank geschmolzen. Die Flüssigkeit wurde bis zur makroskopischen Homogenität mit einem Spatel gerührt und in NMR-Probenröhrchen gefüllt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 20 °C gelagert. Nach einem Tag bzw. 4 Monaten Lagerzeit wurden ¹³C-Spektren von den Gemischen bei unterschiedlichen Temperaturen mit einem Bruker DRX 500 NMR-Spektrometer der Firma Bruker GmbH (D-Rheinstetten) aufgenommen.

3.2.10 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

SAXD-Untersuchungen wurden in einer Lochblendenkamera nach Kiessig (Institutseigenbau) durchgeführt. Als Quelle für Röntgenstrahlung diente eine Feinfokus-Röntgenröhre PW 2213-25 mit Cu-Anode, die von einem Röntgengenerator PW 1710 (beides Philips, NL-Almelo) mit einer Spannung von $U = 40$ kV und einem Strom von $I = 25$ mA versorgt wurde. Die Beugungsbilder wurden mit einer OED-50M mit ASA-SAX-Karte aufgenommen. Die Datenausgabe erfolgte über die Software ASA (alles MBraun, D-Garching). Alle Proben wurden in speziell konstruierte Probenträger eingefüllt (Institutseigenbau). Die Proben wurden entweder vor dem Einfüllen geschmolzen oder („unbehandelte“ Proben) unter flüssigem Stickstoff gemörsert.

3.2.11 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)

Die Proben wurden geschmolzen in einen Aluminiumträger eingebracht und nach abkühlen mit einem Röntgengoniometer PW 1050/25 vermessen. Als „unbehandelt“ bezeichnete Proben wurden stattdessen unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Detektion erfolgte mit einem Xe-Proportionalitätszählrohr PW 1711/10. Das Goniometer wurde auf einem Röntgengenerator PW 1710 mit einer Röhre 2213/20 (Ni-Filter, $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung, $\lambda = 0,154 \text{ nm}$) bei einem Anodenstrom von $A = 25 \text{ mA}$ und einer Betriebsspannung von $U = 40 \text{ kV}$ betrieben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software PC-APD (alles Philips, D-Kassel).

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Zusammensetzung der Lipidsuspensionen

4.1.1 Auswahl der Bestandteile

Als topische Formulierung sollte ein Repellent weitestgehend auf reizende und toxische Substanzen verzichten. Für eine Wirkung ist nur die Konzentration des Wirkstoffs in der Gasphase direkt über der Haut ausschlaggebend, da sie hauptsächlich in der Gasphase wirken, wie Versuche gezeigt haben [Khan und Maibach 1972]. Auf Stoffe, die eine penetrationsfördernde Wirkung haben (*Enhancer*) muss deshalb nach Möglichkeit verzichtet werden, um ein Eindringen in die Haut zu vermeiden.

Es werden nur niedrige Konzentrationen an Wirkstoff benötigt. Die minimale effektive Dosis (MED) für DEET liegt bei $<60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (siehe Kap. 2.1.2) und es werden Wirkstoffkonzentrationen von bis zu 30 % verwendet. Bei 1 mg Formulierung pro cm^2 Haut (ein realistischer Wert, wenn das Repellent nicht zu dünn aufgetragen wird) und einer DEET-Konzentration von 30 % liegt der Wirkstoff also in mindestens 5-fachem Überschuss vor. Da manche Autoren wesentlich kleinere MEDs angeben, ist der Überschuss wahrscheinlich sogar noch höher. Es bietet sich somit an, Diffusionsbarrieren innerhalb der Formulierung zwischen dem Wirkstoff, der Luft und der Haut zu bringen, damit er nur langsam an die

Luft und an die Haut abgegeben wird. Bei der geringen Konzentration, die für eine Wirkung nötig ist, kann davon ausgegangen werden, dass trotzdem genug DEET an die Luft abgegeben wird, um eine Wirkung zu gewährleisten. Diese Verlangsamung der Diffusion dient zum einen der Wirkverlängerung und zum anderen als Schutz vor unerwünschten Wirkungen. Die Firma Bayer hat mit „Autan Family“ eine Formulierung auf den Markt gebracht, die sich die Vorteile einer Diffusionsbarriere zu Nutze macht.

Als Diffusionsbarriere dient im Fall von Autan Family – und auch im Fall der hier untersuchten Formulierungen – eine wässrige Phase. Der lipophile Wirkstoff wird in eine O/W-Emulsion bzw. Suspension eingearbeitet, wodurch er, bevor er die Formulierung verlassen kann, zunächst durch das Wasser diffundieren muss, was durch die sehr geringe Wasserlöslichkeit des DEET zu der verlangsamten Abgabe führt. Ist das Wasser verdunstet, dient im Falle von hypromellosestabilisierten Suspensionen (siehe Kap. 2.2) das verbleibende hochkonzentrierte Hydrogel als Diffusionsbarriere.

In dieser Arbeit wurden DEET-haltige Lipidsuspensionen untersucht. Suspensionen sollten den Wirkstoff langsamer abgeben als Emulsionen, während sich die Verträglichkeit verbessern sollte. Allerdings hat Schepper [Schepper 1999] in orientierenden Versuchen Instabilitäten bei hypromellosestabilisierten, DEET-haltigen Suspensionen mit Softisan 378 und Softisan 100 festgestellt.

4.1.1.1 Wirkstoff

Als Wirkstoff wurde *N,N*-Diethyl-*m*-toluamid – DEET – gewählt, da es weltweit zu den effektivsten und verträglichsten Insektenrepellents (siehe Kap. 2.1.2) zählt. Obwohl die Firma Bayer vollkommen auf den von ihr entwickelten neuen Wirkstoff Bayrepel umgestiegen ist, hat DEET auch heute noch nicht an Bedeutung verloren. Vorteile von Bayrepel liegen hauptsächlich in einer geringfügig besseren Verträglichkeit und in der Tatsache, dass es im Gegensatz zu DEET Kunststoffe nicht angreift. Die Wirksamkeit von DEET ist allerdings vergleichbar, weshalb es wegen seiner hohen Verbreitung weltweit die größere Bedeutung besitzt.

4.1.1.2 Innere Phase der Suspension

Als innere Phase wurden Hartfette, d. h. Gemische aus Mono-, Di- und Triglyceriden gewählt. Emulsionen aus Triglyceriden haben sich bereits als geeignet erwiesen, um als Träger von DEET in polymerstabilisierten Emulsionen zu dienen. Hartfette weisen Ähnlichkeit mit reinen Triglyceriden auf, haben aber einige entscheidende Vorteile. Hartfette müssen als sehr verbreitete Grundlage für Suppositorien viele verschiedene Bedingungen erfüllen können und je nach eingearbeitetem Wirkstoff sehr unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen. Es werden Hartfette mit großen Unterschieden in Polarität und Schmelzpunkt angeboten. Als Stoffgemische sind Hartfette im Bereich Variabilität Monosubstanzen weit überlegen. Außerdem sind Hartfette gut hautverträglich.

Es wurden Hartfette mit Schmelzbereichen gewählt, die beim Auftragen auf die Haut nicht schmelzen. Es ist aber mit einer Erweichung der Partikel zu rechnen. Bei Anwendung in sehr heißen Gebieten kann es zu einem Schmelzen der Partikel kommen, da aber die retardierende Wirkung von Emulsionen belegt ist [Schepper 1999], würde das Schmelzen keine erheblichen Nachteile nach sich ziehen.

Die Affinität des DEET zum Hartfett spielt eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund wurden Hartfette mit stark unterschiedlichen Hydroxylzahlen herangezogen. Da die Hydroxylzahl ein Maß für die freien Hydroxylgruppen ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei einem breiten Bereich an Hydroxylzahlen eine entsprechend variable Hydrophilie vorliegt. Durch unterschiedliche Konzentrationen an Mono- und Diglyceriden ist zusätzlich ein breites Spektrum an Kristallisationsverhalten abgedeckt.

Die Hartfette der Firma Gattefossé mit der Bezeichnung Suppocire AM (Hydroxylzahl 10), Suppocire C (Hydroxylzahl 20–30) und Suppocire NA50 (Hydroxylzahl 38–48) erfüllen diese Bedingungen (siehe Tab. 3.1).

4.1.1.3 Stabilisatoren

Da es sich bei Tensiden um Stoffe handelt, die abhängig von ihrer chemischen Struktur ein mehr oder weniger irritatives Potential für die Haut aufweisen und teilweise auch noch eine

penetrationsverbessernde Wirkung aufweisen, wurde bei den Untersuchungen weitgehend auf sie verzichtet. Stattdessen wurde auf den Polymeremulgator Hypromellose zurückgegriffen, der sich in der Arbeit von K. Schepper [Schepper 1999] als vorteilhaft erwiesen hat und der als Polymer ein zu großes Molekulargewicht aufweist, um toxische oder resorptionsfördernde Wirkung aufweisen zu können.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die beiden Handelsprodukte Metolose 90 SH 100 und Metolose 90 SH 4000 (nachfolgend als Metolose 100 und Metolose 4000 bezeichnet) als makromolekulare Emulgatoren eingesetzt. Die Emulgatoren liefern Lösungen mit sehr unterschiedlichen Viskositäten (siehe Kap. 3.1.3), weshalb sie in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden.

Es wurden des Weiteren Untersuchungen mit Tensiden durchgeführt.

4.1.1.4 Konservierungsmittel

Die untersuchten Systeme sind anfällig gegen Verkeimung. Aus diesem Grund wurden alle Suspensionen mit 0,005 % Thiomersal konserviert, um ein Keimwachstum während der Lagerung ausschließen zu können.

4.1.2 Konzentration der Bestandteile

Die Lipidkonzentration wurde auf 20 % festgelegt. In der Arbeit von K. Schepper [Schepper 1999] hat sich ein Fettgehalt von 20–30 % als optimal herausgestellt. Da die in dieser Arbeit untersuchten Systeme aber wesentlich weniger DEET enthielten, wurde mit einer konstanten Lipidkonzentration von 20 % gearbeitet, was eine gute Vergleichbarkeit der Proben gewährleistete.

DEET wurde in einem Bereich von 0–10 % eingesetzt.

Hypromellose wurde in einer Konzentration von 1–3 % (Metolose 100) bzw. 0,5–2 % (Metolose 4000) eingesetzt.

Thiomersal wurde in der im DAC angegebenen üblichen Konzentration von 0,005 % eingesetzt.

4.2 Vorversuche

Vorversuche zeigten, dass sich DEET-haltige Suspensionen relativ leicht herstellen lassen, dass eine Stabilität der Suspensionen über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen in vielen Fällen allerdings nicht gegeben ist. Die gleichen Systeme sind über mindestens einen Tag stabil, solange sich die innere Phase in flüssigem Zustand befindet, sie also bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt gelagert werden.

Direkt nach der Herstellung sind die Systeme je nach verwendetem Lipid- und Hypromellosegehalt mehr oder weniger viskose, in allen Fällen gießfähige, Systeme, die auch nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur – nach der Herstellung haben die Systeme eine Temperatur von 45–50 °C – homogen sind. Instabilitäten manifestieren sich erst nach einer gewissen Lagerdauer unterhalb der Schmelztemperatur der inneren Phase des Systems.

Werden die Systeme bei einer Temperatur gelagert, die ein Kristallisieren der Lipide verhindert, sind sie über mindestens einen Tag stabil und die Partikel neigen nicht zur Agglomeration.

Aufrahmung und Sedimentation treten bei den hergestellten Suspensionen häufig in unüblicher Weise aber in relativ geringem Ausmaß auf (s. u.). Die Systeme bilden eine salbenartige, unstrukturierte Konsistenz aus, deren Hauptmerkmale der Verlust der Gießfähigkeit und der Flexibilität, sowie eine Aufhebung des Suspensions-Charakters des Systems sind. Die zunächst gießfähigen Suspensionen verändern ihre Festigkeit, die sich am ehesten als „butterartig“ beschreiben lässt. Eine Scherung des Systems bewirkt eine plastische Verformung.

Diese Konsistenzänderung tritt „sprunghaft“ innerhalb von 1–2 Tagen auf. Systeme, die mikroskopisch noch als stabile Suspensionen zu erkennen sind, behalten die Eigenschaften einer Flüssigkeit (reversible Verformbarkeit, Fließfähigkeit) – wenn auch einer hochviskosen. Nachdem sich die Struktur der Systeme aber verändert hat, nehmen sie die bereits beschriebenen „butterartigen“ Eigenschaften an.

Bei der Verwendung von Suppocire AM kommt es im Gegensatz zu den anderen Lipiden selten zu dieser Verfestigung der Systeme. Die Suspensionen bleiben meist gießfähig. Sie zeigen ihre Instabilität erst bei mikroskopischer Untersuchung.

Bei der Lagerung der Suspensionen kommt es teilweise zu einer „doppelten Aufrahmung“. Zum einen bildet sich auf manchen Proben dünne feste Lipidschichten, zum anderen reichert sich unter der Probe in wenigen Fällen eine Flüssigkeit an. Diese Schicht ist transparenter als der Rest der Suspension, aber nicht völlig klar. Da sowohl DEET als auch die Lipide eine geringere Dichte als Wasser haben, handelt es sich höchstwahrscheinlich um Wasser, darin gelöste Stoffe wie z. B. sehr geringe DEET-Mengen und eine geringe Konzentration von Lipidpartikeln, die suspendiert vorliegen. Da sich die Schicht am Grund der Probengefäße befindet, war sie einer Untersuchung aufgrund der schwierigen Probenentnahme nicht zugänglich. Die Grenzen zwischen den einzelnen Schichten sind verhältnismäßig scharf.

Zu beobachten ist also eine besondere Form der Aufrahmung, die zu einer Dreischichtenbildung führt. Ist keine geeignete Menge an Hypromellose im System verteilt, so kann sich eine Instabilität durch die Aufrahmung von Teilchen manifestieren. Die oben befindlichen Partikel werden einem relativ hohen Druck von den nachrückenden Partikeln ausgesetzt, was zu einer Versinterung der Partikel führt. Es bildet sich eine Schicht aus festem Hartfett.

Die Partikel in den hergestellten Suspensionen neigen zur Agglomeration (s. u.). Im Ruhezustand bilden die Suspensionen eine Art Gelgerüst, das die Aufrahmung beeinträchtigt. Dieses „Gelgerüst“ sorgt dafür, dass die Masse an Lipidpartikeln nur in seiner Gesamtheit aufrahmen kann. So ist die dritte klar abgegrenzte Schicht zu erklären, die sich am Grund der Probengefäße bildet. Sie enthält nur wenige Lipidpartikel, die nicht agglomeriert vorliegen.

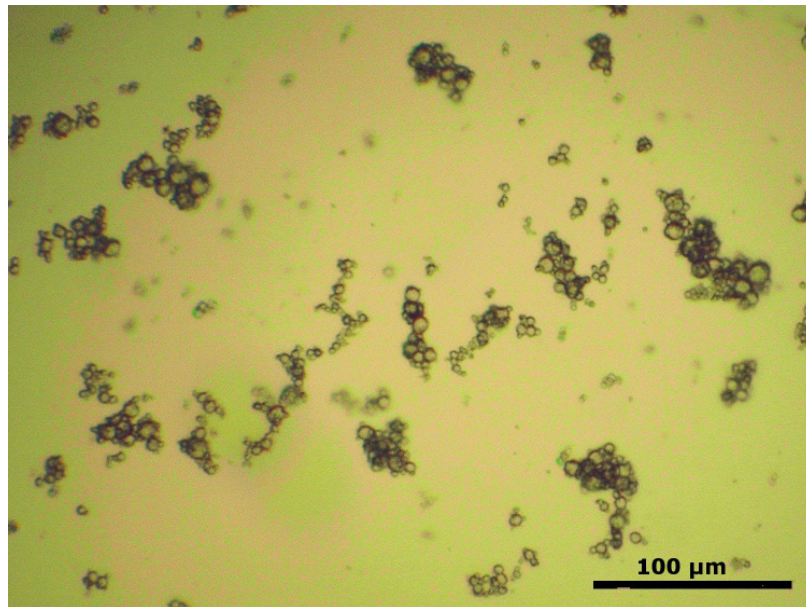


Abbildung 4.1: Suspension mit Suppocire C, Metolose 100 und 0 % DEET, 17 Tage gelagert. Die Partikel der Suspension liegen als individuelle Partikel vor. Aufnahme ohne Polarisationsfilter.

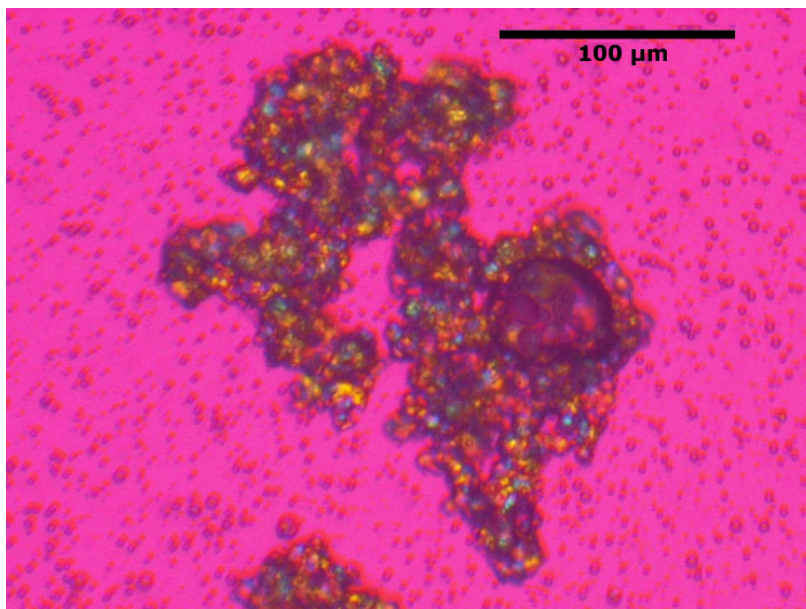


Abbildung 4.2: Suspension mit Suppocire AM, Metolose 100 und 2 % DEET, 4 Tage gelagert. Die Partikel sind versintert; kleine, individuelle Partikel sind noch vorhanden.

Bei Lagerung kommt es zu Formveränderungen der Partikel, in geringem Maße zu Größenwachstum und -verkleinerung und zur Versinterung von Partikeln. Unter Umständen könnte im Fall der verwendeten Suspensionen auch von Koaleszenz gesprochen werden, da die verwendeten Hartfette auch in festem Zustand nicht vollständig auskristallisiert sind, sondern noch halb feste Teilbereiche aufweisen; im Folgenden wird der Begriff „Versinterung“ verwendet werden. Unter dem Polarisationsmikroskop ist gut zu erkennen, wie die einzelnen Partikel zunächst agglomerieren und dann nach und nach ihre Individualität verlieren. Im Extremfall sind überhaupt keine einzelnen Partikel mehr zu erkennen und die Suspension wird zu einem unstrukturierten, salbenartigen System.

Die Abbildungen 4.1 und 4.2 stellen exemplarisch die unterschiedlichen Stabilitäten dar. Abb. 4.1 zeigt eine stabile Suspension. Auch nach mehrtägiger Lagerung liegt die innere Phase noch in Form von individuellen Partikeln vor. Bei Abb. 4.2 sind die Partikel nach Agglomeration versintert.

Da in Vorversuchen, keine stabilen DEET-haltigen Suspensionen hergestellt werden konnten, wurden weitere Untersuchungen angestellt, die das beobachtete Verhalten der Suspensionen klären.

4.3 Verhalten von DEET-Lipid-Gemischen

4.3.1 Mischbarkeit der Lipide mit DEET

Die Mischbarkeit von DEET mit den verwendeten Lipiden bildet die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen. Da sich das DEET in der inneren Phase des Systems aufhalten muss, damit die Suspension den gewünschten retardierenden Effekt aufweist, muss die Affinität zwischen DEET und Lipid ausgesprochen hoch sein. Ein zu schneller Austritt des DEET aus der Fettphase würde eine Retardierung der Wirkung verhindern. Die Struktur von DEET zeigt, dass der Stoff einen ausgesprochen lipophilen Charakter aufweist (siehe Abb. 2.1). Die Wasserlöslichkeit ist sehr gering. Der Verteilungskoeffizient liegt abhängig von DEET-Gehalt und verwendetem Lipid zwischen 12 und 35 (siehe Kap. 4.4.1).

Vorproben zeigten, dass sich DEET mit den geschmolzenen Hartfetten vollständig mischt. DEET wurde in die geschmolzenen Lipide (Suppocire AM, Suppocire NA50 und Suppocire C) in Konzentrationen bis zu 50 % eingearbeitet. Durch kurzes Rühren mit dem Spatel gelang es, eine makroskopisch homogene Mischung herzustellen, die sich auch nach dem Abkühlen nicht sofort wieder entmischte. Auch Untersuchungen mit einem Polarisationsmikroskop zeigten kurz nach dem Abkühlen eine homogene Mischung.

Während der Lagerung der Mischungen traten allerdings Instabilitäten zu Tage. Tab. 4.1 gibt den Zustand der Mischungen wieder, nachdem sie 20 Tage bei 20 °C gelagert wurden.

Tabelle 4.1: Entmischung von Lipid-DEET-Mischungen nach 20 Tagen Lagerung

Lipid	DEET-Konzentration [% m/m]	Entmischung
Suppocire AM	10	nein
Suppocire AM	35	ja
Suppocire AM	50	ja
Suppocire C	10	nein
Suppocire C	35	nein
Suppocire C	50	nicht eindeutig
Suppocire NA50	10	ja
Suppocire NA50	35	ja
Suppocire NA50	50	ja

Das auskristallisierte Fett ist durch sein anisotropes Verhalten unter dem Polarisationsmikroskop durch unterschiedlich gefärbte Flächen gut zu erkennen. Wie in Abb. 4.3 zu sehen, zeigt sich eine Entmischung durch rosa-farbige, also isotrope Bereiche innerhalb des Bildes. Zu einem späterem Zeitpunkt ist bei manchen Proben (Suppocire AM mit 50 % bzw. 35 % DEET) eine Entmischung auch makroskopisch eindeutig zu erkennen.

In Abb. 4.3 erkennt man die Trennung zwischen den Lipidkristallen und einer flüssigen Substanz recht gut. Bei dieser Probe war die Entmischung auch makroskopisch bereits zu sehen. Abb. 4.4 zeigt eine homogene Mischung. Hier sieht man, dass eine gleichmäßige Fläche von einer kristallisierten Substanz, dem Gemisch, vorliegt.

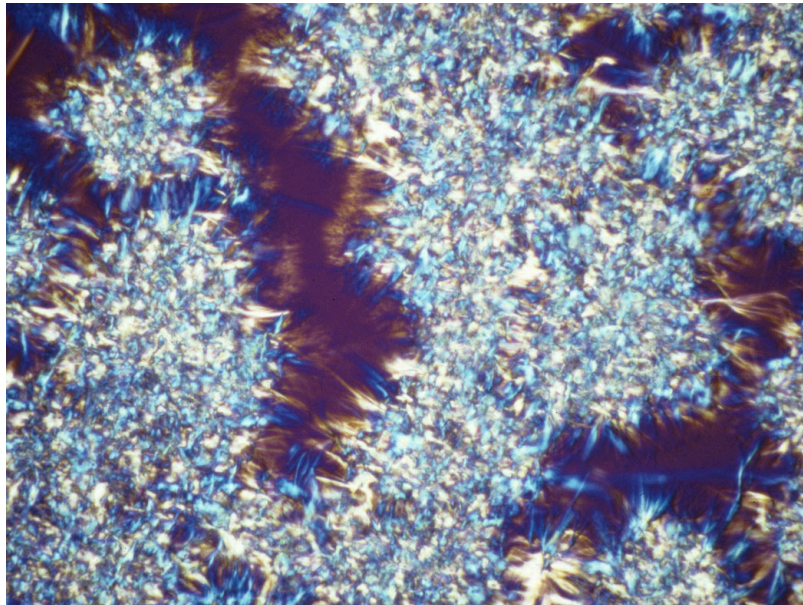


Abbildung 4.3: Mischung von Suppocire AM mit 35 % DEET, 2 Tage gelagert. Es hat sich eine Flüssigkeit von den Kristallen getrennt.

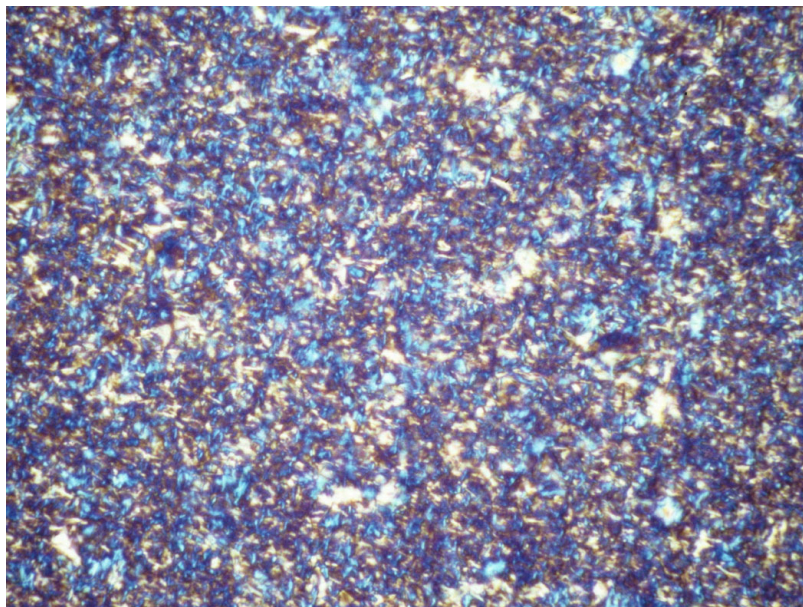


Abbildung 4.4: Mischung von Suppocire C mit 50 % DEET, 2 Tage gelagert. Die Mischung erscheint homogen.

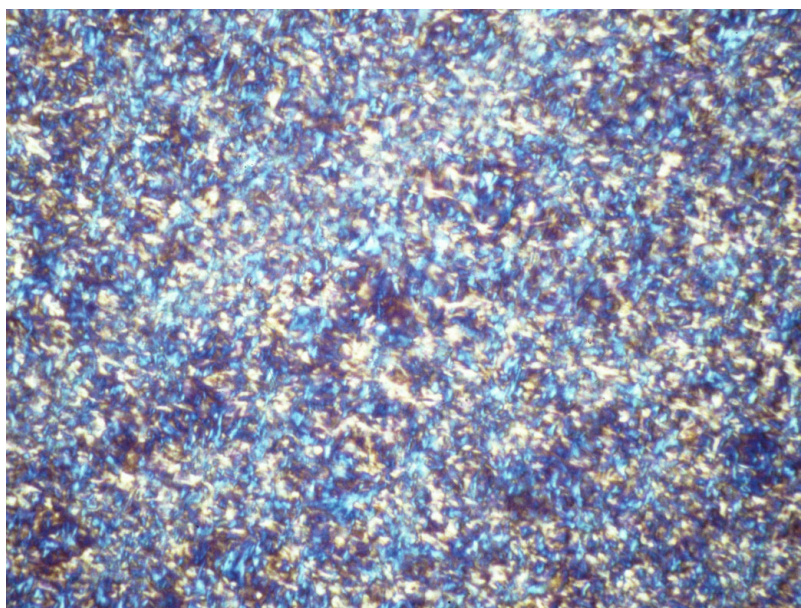


Abbildung 4.5: Mischung von Suppocire NA50 mit 50 % DEET, 2 Tage gelagert. Im unteren Bereich des Bildes sind Ansätze einer Trennung zu erkennen.

In Abb. 4.5 ist eine Probe dargestellt, bei der sich eine Trennung noch nicht vollständig ausgebildet hat. Wie man an diesem Beispiel erkennen kann, ist mit dieser Methode kaum zu erkennen, wann genau eine Trennung beginnt. Da nach einer Trennung keine eindeutig erkennbare Grenze zwischen den Kristallen und der Flüssigkeit entsteht, ist es recht schwer abzuschätzen, ob eine kleine, rosa gefärbte Fläche von einer Trennung herrührt oder ein Teil einer polarisationsmikroskopischen Darstellung eines Kristalls ist. Die Schichtdicke der Probe spielt bei dieser Art der Untersuchung eine weitere entscheidende Rolle. Größere Schichtdicken können erste Anzeichen für eine Phasentrennung verschleiern.

Trotz allem ist die Untersuchung sehr gut dazu geeignet, um Entmischungstendenzen festzustellen. Eine fortgeschrittene Trennung der Substanzen lässt sich auf diese Weise einfach und schnell erkennen.

4.3.2 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

4.3.2.1 Lipid-DEET-Mischungen

Um weitere Aussagen über die Lipid-DEET-Mischungen machen zu können, wurden Aufnahmen mit dem TEM gemacht. Zu diesem Zweck wurden Mischungen von jeweils einem Lipid mit 50 % DEET hergestellt und nach kurzer Lagerung gebrochen.

Wie in Abb. 4.6 bis 4.8 dargestellt, zeigen alle drei Mischungen treppenähnliche Abbruchkanten, wobei die Strukturen unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Bei Suppocire C sind die wenigsten Bruchkanten zu finden, bei Suppocire NA50 die meisten.

4.3.3 Röntgenstrukturanalyse

Mit Hilfe von Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) und Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD) wurde das Verhalten von Mischungen aus DEET und den verschiedenen Lipiden weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mischungen von DEET und Lipid hergestellt und nach einem Tag bzw. mehreren Wochen Lagerdauer vermessen. Die Zusammensetzung der Proben ist Tab. 4.2 zu entnehmen. Der Zeitpunkt der zweiten Messung lag zwischen 18 und 29 Tagen Lagerung, also nach einer Lagerdauer, nach der die Veränderungen weitgehend abgeschlossen sind (siehe auch Kap. 4.3.4). Des Weiteren wurden Untersuchungen an den unaufgeschmolzenen Lipidplättchen durchgeführt.

4.3.3.1 WAXD (DEET-Lipid-Mischungen)

Suppocire AM: Das Diffraktogramm der unbehandelten Fettplättchen zeigt ein völlig anderes Bild als das des kurz vor der Untersuchung aufgeschmolzenen Lipids (siehe Abb. 4.9). Ein Aufschmelzen bewirkt, dass das Lipid in einer β' -Modifikation kristallisiert. Dies lässt sich aus den beiden Peaks bei $2\Theta = 20,7^\circ$ und $2\Theta = 23,3^\circ$ schließen [Müller et al. 1986]. Innerhalb einer Lagerdauer von 24 Tagen verändert sich dieses Bild praktisch nicht (aufgrund der großen Ähnlichkeit sind die Diffraktogramme der kürzer gelagerten Proben nicht dargestellt). Das unbehandelte Lipid hingegen zeigt viele schmale

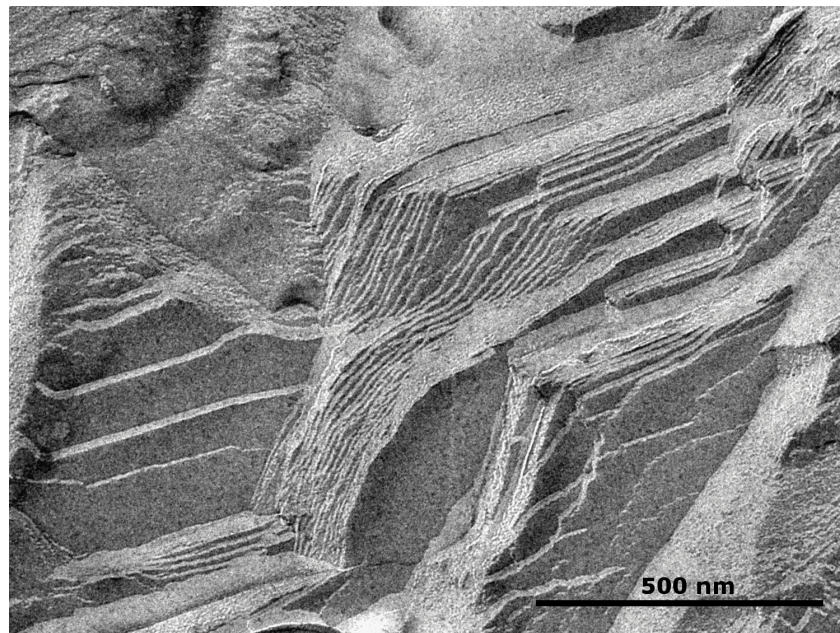


Abbildung 4.6: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gemisches von Suppocire NA50 und DEET (1:1). Der Balken entspricht 500 nm.

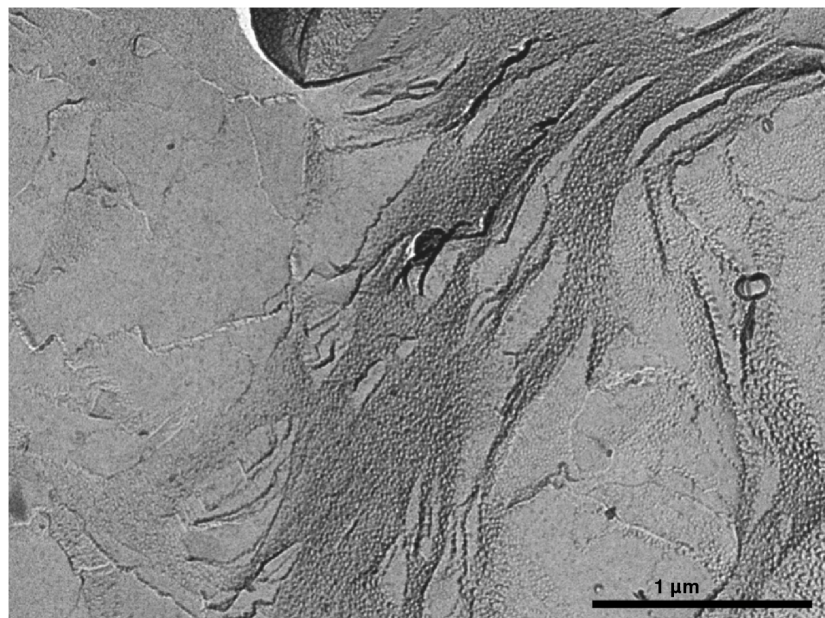


Abbildung 4.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gemisches von Suppocire C und DEET (1:1). Der Balken entspricht 1 μm.

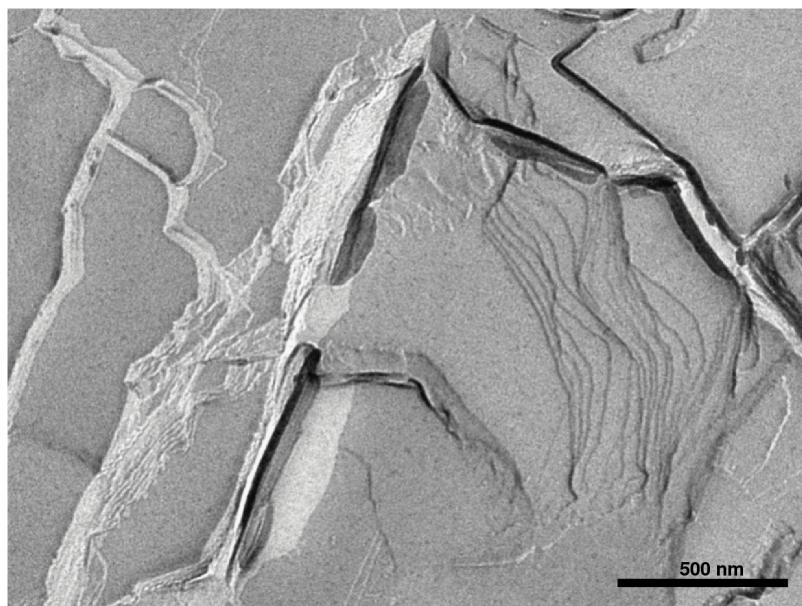


Abbildung 4.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gemisches von Suppocire AM und DEET (1:1). Der Balken entspricht 500 nm.

Tabelle 4.2: DEET-Lipid-Mischungen zur Untersuchung mittels Röntgendiffraktometrie. Alle Angaben sind in Massenprozent.

Art des Lipids	Probenbezeichnung	Lipid [%]	DEET [%]
Suppocire AM	AM	100	0
Suppocire AM	AM 70	70	30
Suppocire AM	AM 50	50	50
Suppocire AM	AM 30	30	70
Suppocire NA50	NA50	100	0
Suppocire NA50	NA50 70	70	30
Suppocire NA50	NA50 50	50	50
Suppocire NA50	NA50 30	30	70
Suppocire C	C	100	0
Suppocire C	C 70	70	30
Suppocire C	C 50	50	50
Suppocire C	C 30	30	70

Peaks zwischen $2\Theta = 19^\circ$ und $2\Theta = 25^\circ$. Stoffgemische wie das vorliegende Hartfett zeigen normalerweise viele Peaks unterschiedlicher Größe und Breite aufgrund der vielen verschiedenen Kristallformen, die sich ausbilden können. Ob es sich nun um eine β -Modifikation, eine β' -Modifikation oder um eine der vielen möglichen Übergangsformen handelt, ist aus den vorliegenden Bildern nicht zu ersehen. Die Dreierkombination der Peaks im Diffraktogramm lässt aber auf eine β -Konformation schließen. Um nach dem Aufschmelzen wieder zu dieser Konformation zurückzufinden, benötigt das Fett also wesentlich länger als 3,5 Wochen. Je nach Herstellungsmethode der Fette (diese ist nicht bekannt), könnte eine Rückveränderung in die Konformation der unveränderten Lipide nach dem Aufschmelzen auch gar nicht stattfinden.

Eine Zugabe von DEET bewirkt eine wesentlich schnellere Umwandlung, wobei größere DEET-Konzentrationen dies beschleunigen. In Abb. 4.10 sind beispielhaft die Diffraktogramme der Probe AM 70 nach 1 bzw. 18 Tagen Lagerung dargestellt. Die Diffraktogramme weisen einen Halo auf, der durch das amorphe DEET verursacht wird, im Bereich zwischen $2\Theta = 19^\circ$ und $2\Theta = 25^\circ$ sind jedoch Spitzen von Peaks zu erkennen, die aus dem Halo herausragen. Probe AM 70 zeigt nach einem Tag Lagerung noch Ähnlichkeiten zu dem aufgeschmolzenen reinen Fett, die Peakspitzen von Probe AM 50 (nicht dargestellt) haben sich dem Aussehen der Peakspitzen des unbehandelten Fettes angenähert. Diese Ähnlichkeit steigt weiter bei Probe AM 30. Eine längere Lagerung (18 bzw. 24 Tage) bringt Diffraktogramme hervor, die, soweit sich das in Anbetracht des großen Halos des DEET beurteilen lässt, sehr stark dem des unbehandelten Fettes ähneln (einzig der Peak bei $2\Theta = 19^\circ$ ist bei der Lipid-DEET-Mischung nicht mehr vorhanden).

Die Tatsache, dass eine Zugabe von DEET eine beschleunigte Rückumwandlung in die Ausgangskonformation bewirkt, lässt den Schluss zu, dass eine lange Lagerung des aufgeschmolzenen reinen Hartfetts den gleichen Effekt erzielt.

Suppocire NA50 zeigt ein ähnliches Verhalten. In Abb. 4.11 ist das Diffraktogramm der unbehandelten Fettplättchen von Suppocire NA50 dargestellt. Die drei Peaks zwischen $2\Theta = 18^\circ$ und $2\Theta = 25^\circ$ weisen auf eine β -Modifikation hin. Wird das Fett aufgeschmolzen, zeigt es wie in Abb. 4.11 rechts dargestellt nach Lagerung ein anderes Bild. Das Diffraktogramm weist an der gleichen Stelle nur zwei Reflexe auf, was für das Vorliegen einer

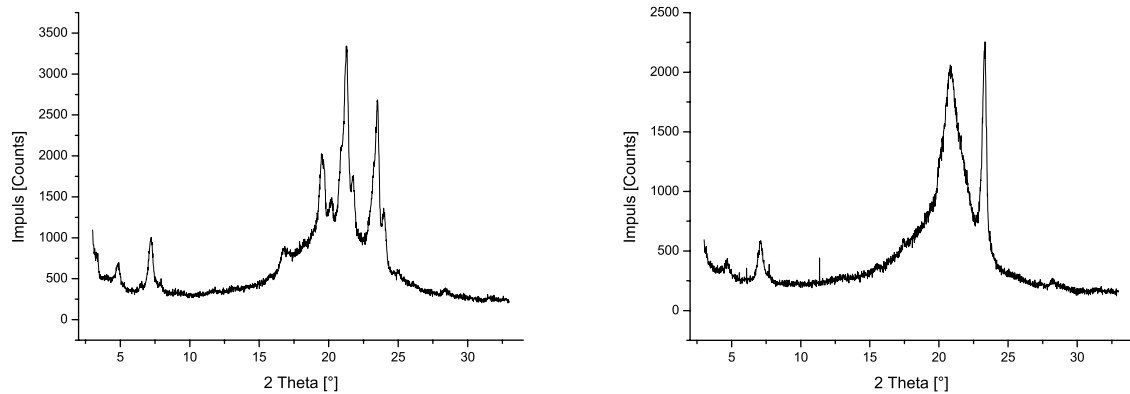


Abbildung 4.9: Diffraktogramm (WAXD) von Suppocire AM. Links: unbehandelte Plättchen. Rechts: aufgeschmolzenes Fett nach 24 Tagen Lagerung.

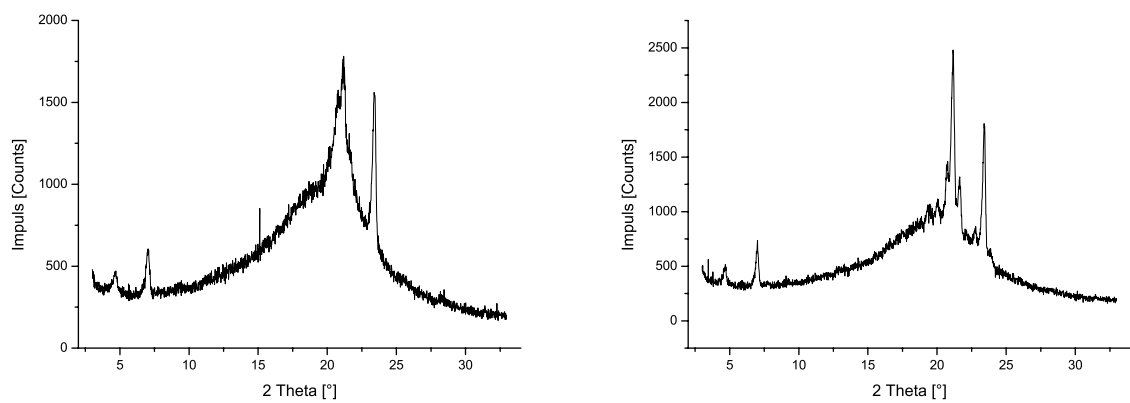


Abbildung 4.10: Diffraktogramm (WAXD) der Probe AM 70. Links: 1 Tag gelagert. Rechts: 18 Tage gelagert.

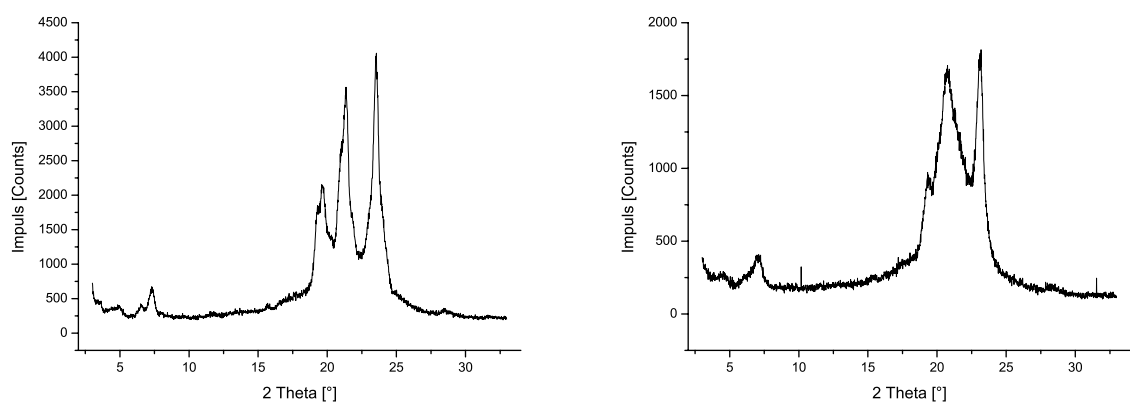


Abbildung 4.11: Diffraktogramm (WAXD) von Suppocire NA50. Links: unbehandelte Plättchen. Rechts: aufgeschmolzenes Fett nach 24 Tagen Lagerung.

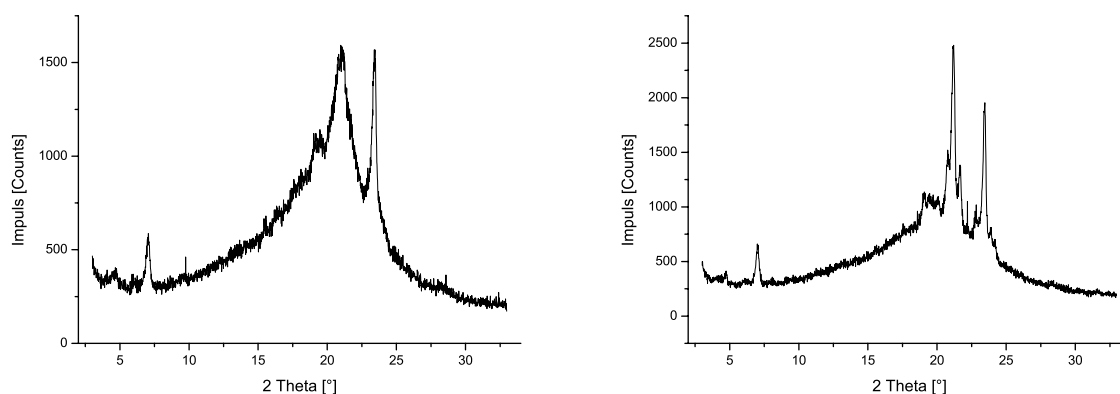


Abbildung 4.12: Diffraktogramm (WAXD) der Probe NA50 70. Links: 1 Tag gelagert. Rechts: 18 Tage gelagert.

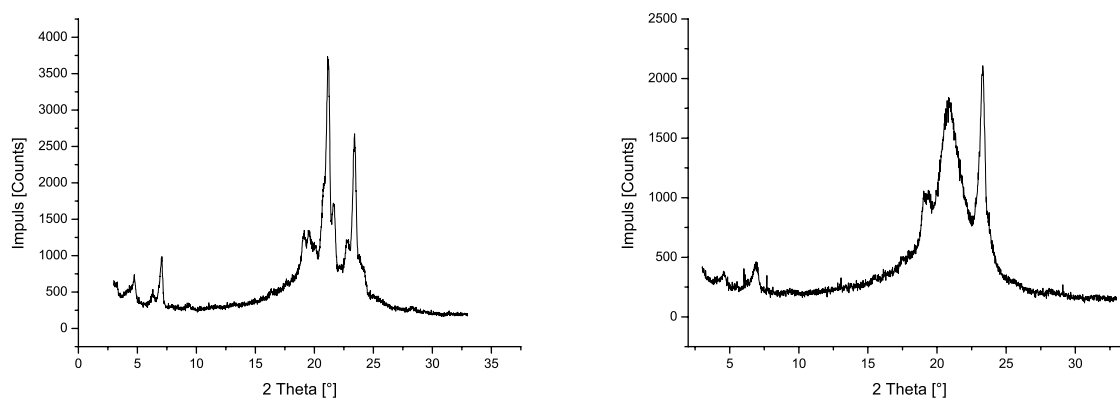


Abbildung 4.13: Diffraktogramm (WAXD) von Suppocire C. Links: unbehandelte Plättchen. Rechts: aufgeschmolzenes Fett nach 24 Tagen Lagerung.

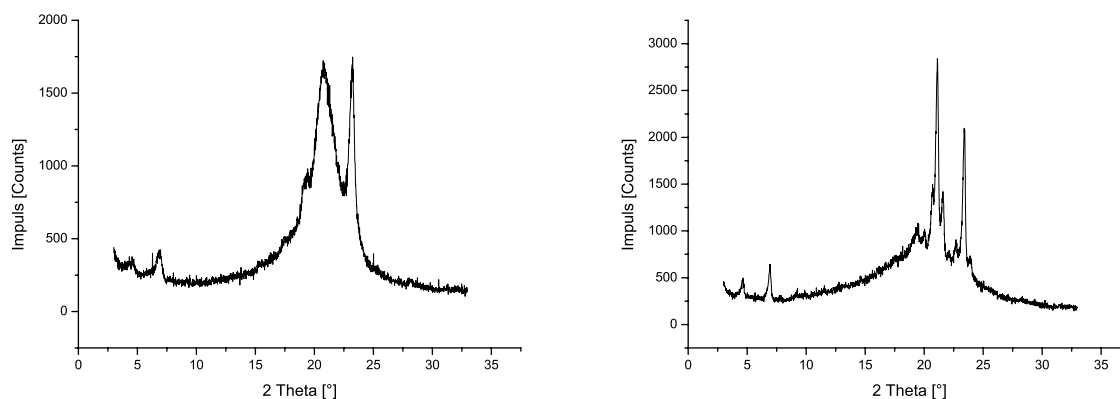


Abbildung 4.14: Diffraktogramm (WAXD) der Probe C 70. Links: 1 Tag gelagert. Rechts: 18 Tage gelagert.

β' -Modifikation spricht. Im Laufe der Lagerung verändert sich das Bild langsam. Nach 24 Tagen hat sich im Ansatz bereits der dritte Reflex der β -Modifikation oder einer Übergangsform gebildet. Dieser war nach 7 Tagen als Schulter zu erkennen. Der rechte Reflex ist schmaler und höher geworden. Ähnlichkeiten zum Diffraktogramm des unbehandelten Lipids sind unübersehbar. Das Diffraktogramm des aufgeschmolzenen Suppocire AM (s. o.) weist allerdings auch Ähnlichkeiten zu dem des aufgeschmolzenen Suppocire NA50 auf. Die Lage und Form der beiden rechten Peaks stimmen recht gut überein. Der mittlere Peak hingegen weist leichte Unterschiede in seiner Form zum unbehandelten Suppocire NA50 auf. Einzig der linke kleine Peak, der sich nach 7 Tagen bereits als Schulter andeutet, ist nicht vorhanden.

Wie bei Suppocire AM wird auch hier eine Umwandlung nach dem Aufschmelzen des Lipids durch die Zugabe von DEET beschleunigt. Das Diffraktogramm der Probe NA50 70 (siehe Abb. 4.12) weist nach 18 Tagen Lagerung praktisch keinen Unterschied zu dem korrespondierenden Diffraktogramm der Probe AM 70 auf. Eine Erhöhung der DEET-Konzentration beschleunigt diese Umwandlung noch weiter, wobei allerdings kein Unterschied zwischen 50 % und 70 % DEET festgestellt werden konnte.

Suppocire C verhält sich analog zu Suppocire NA50 einzig das Diffraktogramm der unbehandelten Lipidplättchen hat ein anderes Aussehen. Es ähnelt sehr stark dem Diffraktogramm des unbehandelten Suppocire A. Die Abb. 4.13 und 4.14 zeigen beispielhaft einige Diffraktogramme.

Bei allen Lipiden wurde ein starker Unterschied zwischen den Diffraktogrammen des unbehandelten und aufgeschmolzenen Lipids festgestellt. Dieser Umstand liegt in der Tatsache begründet, dass die Modifikation eines Lipids stark von seiner Herstellung abhängig ist. Da die Änderung der Modifikation außerdem stark von der Lagerdauer abhängt, ist zu vermuten, dass eine längere Lagerung der Lipide bewirken könnte, dass sich die Diffraktogramme der aufgeschmolzenen Lipide denen der Unbehandelten weiter annähern. Ausnahme bei dieser Vermutung stellt das Suppocire NA50 dar (s. u.).

Ein Zusatz von DEET bewirkt bei allen drei Lipiden, dass das Fett in relativ kurzer Zeit ein einheitliches oder zumindest sehr ähnliches Reflexmuster annimmt. Eine Erhöhung des DEET-Gehalts von 30 % auf 50 % bewirkt bei allen Fetten eine Beschleunigung.

Suppocire NA50 kristallisiert nach einem Zusatz von DEET genauso aus wie die anderen Fette, das Diffraktogramm des unbehandelten Fettes ist allerdings unterschiedlich. Da die Herstellungsmethode der Lipidplättchen nicht bekannt ist, kann dies eine Auswirkung einer anderen Herstellungsmethode als bei Suppocire C oder Suppocire AM sein.

Ein Zusatz von DEET vereinheitlicht also das Kristallisationsverhalten der Fette. Nach 18 Tagen Lagerung weisen alle Mischungen Reflexbilder auf, die kaum voneinander differieren.

4.3.3.2 SAXD (DEET-Lipid-Mischungen)

Kleinwinkeldiffraktogramme von den Lipiden und ihren Mischungen mit DEET zeigen alle ein ähnliches Bild. Nach einem starken Reflex 1. Ordnung bei Kanal 315–325 (im Folgenden als Reflex I bezeichnet) sind weitere Reflexe nur noch sehr schwach und teilweise gar nicht mehr zu erkennen. Manche Proben zeigen noch einen zusätzlichen Reflex vor Reflex I.

Unbehandeltes Suppocire AM zeigt zusätzlich zu Reflex I eine weitere Interferenz ungefähr bei Kanal 720 (siehe Abb. 4.16). Nach der Zumischung von DEET ist bei Kanal 520 ein weiterer Reflex zu erahnen (siehe Abb. 4.17), der bei erhöhtem DEET-Anteil deutlicher wird. Die Äquidistanz der drei Interferenzen deutet auf eine geordnete Schichtenstruktur innerhalb des Kristalls hin¹. Bei den unbehandelten Plättchen ist der Reflex 2. Ordnung zwar im Grundrauschen nicht zu erkennen, dennoch ist eine Regelmäßigkeit unverkennbar. Untersuchungen mit dem TEM zeigen treppenartige Abbruchkanten, die zum gleichen Schluss führen (siehe 4.3.2). Grund für die Periodizität ist die Molekulanordnung der β -Modifikation bei Triglyceriden, die an manchen Stellen im Lipidkristall zu finden ist. Müller [Müller et al. 1986] erklärt den Aufbau der verschiedenen β -Modifikationen und zeigt am

¹In den Vergrößerungen ist ein zusätzlicher Reflex ungefähr bei Kanal 620 zu erkennen. Dieser Reflex ist auf einen Gerätefehler zurückzuführen, der bei allen Messungen zu finden ist und auch bei anderen Messungen innerhalb der Arbeitsgruppe beobachtet werden konnte. Er basiert nicht auf gemessenen Strukturen.

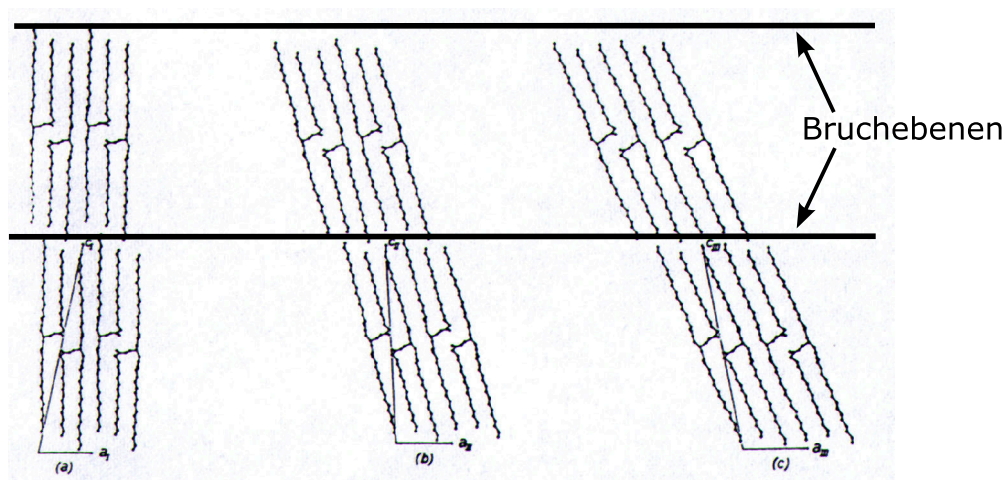


Abbildung 4.15: Molekülanordnungen verschiedener β -Modifikationen von Tripalmitin [Müller et al. 1986]

Beispiel von Tripalmitin die Anordnung der Lipidmoleküle. In dieser Abbildung (Abb. 4.15) lässt sich gut erkennen, wie es zu einer Schichtenbildung im Kristall und zu treppenartigen Bruchkanten beim Gefrierbruch kommen kann.

Suppocire NA50 (hier nicht dargestellt) zeigt generell das gleiche Bild. Das Diffraktogramm der unbehandelten Plättchen unterscheidet sich praktisch nicht von dem von Suppocire AM, wird allerdings DEET hinzugemischt bildet sich ein kleiner zusätzlicher Reflex vor Reflex I, was auf mindestens eine weitere Kristallmodifikation hindeutet. Die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen (siehe Kap. 4.3.4) decken sich mit dieser Beobachtung. Die Schichtenstruktur kann bei reinem aufgeschmolzenem Suppocire NA50 und bei einer Mischung von Lipid und 70 % DEET allerdings aufgrund des Fehlens von der Interferenz bei Kanal 520 nicht mehr erkannt werden. Zusätzlich ist der Reflex 3. Ordnung bei der Mischung mit 70 % DEET etwas verschoben.

Suppocire C verhält sich entsprechend Suppocire NA50, allerdings sind hier die Reflexe wesentlich deutlicher ausgeprägt; in jedem Diffraktogramm sind Reflexe erster, zweiter und dritter Ordnung zu erkennen. Zwei Kleinwinkeldiffraktogramme sind in Abb. 4.18 und 4.19 dargestellt.

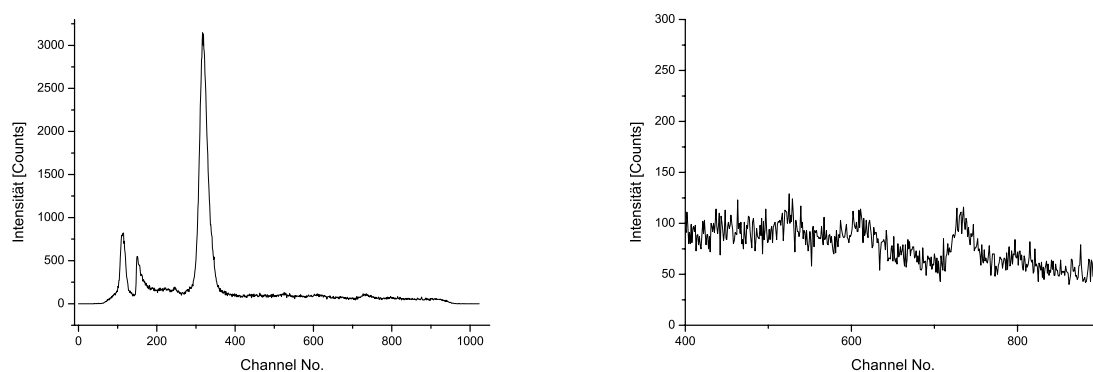


Abbildung 4.16: Links: Diffraktogramm (SAXD) von Suppocire AM, unbehandelt. Rechts: ein Ausschnitt

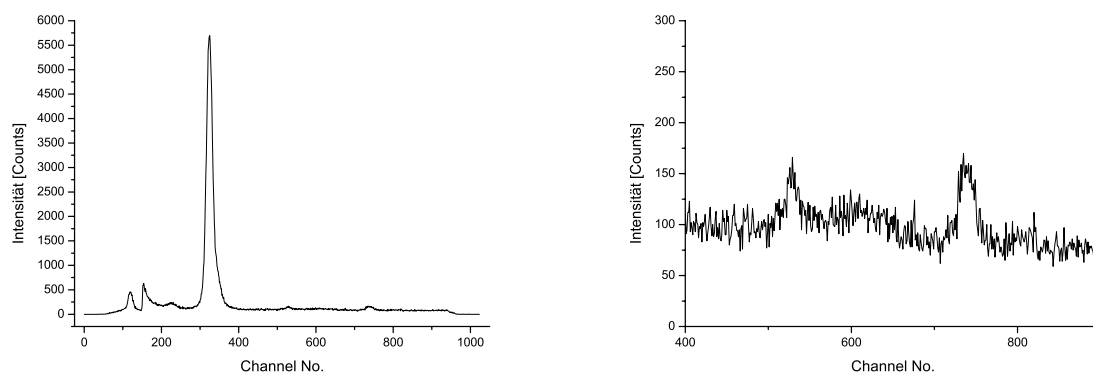


Abbildung 4.17: Diffraktogramm (SAXD) von einer Mischung von Suppocire AM mit 50 % DEET. 29 Tage gelagert. Bei Kanal 530 (Ausschnitt rechts dargestellt) ist ein Reflex 2. Ordnung zu erahnen. Ausschnittsvergrößerung rechts.

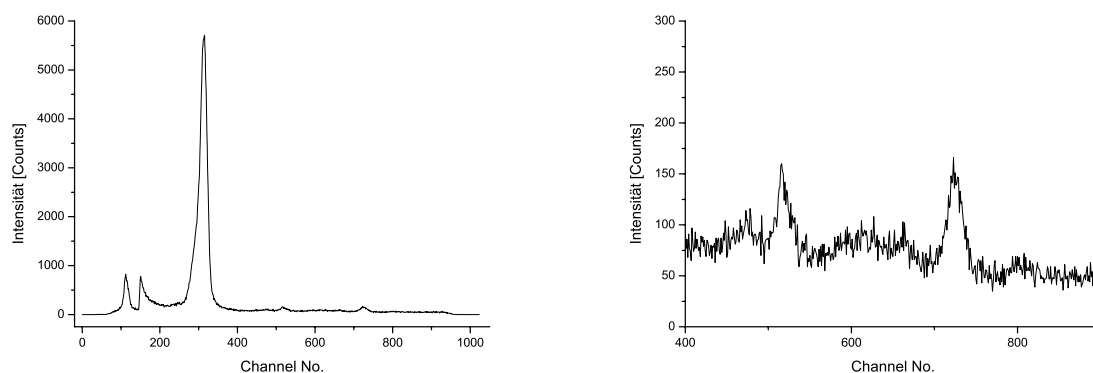


Abbildung 4.18: Diffraktogramm (SAXD) von Suppocire C, unbehandelt. Ausschnittsvergrößerung rechts.

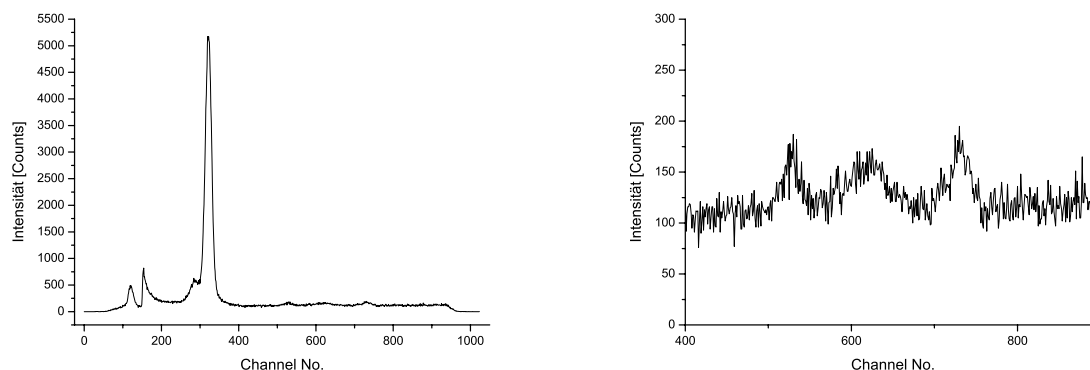


Abbildung 4.19: Diffraktogramm (SAXD) von einer Mischung von Suppocire C mit 50 % DEET. 29 Tage gelagert. Ausschnittsvergrößerung rechts.

Suppocire AM bildet bei der Zumischung von DEET nicht die gleichen zusätzlichen Reflexe vor Reflex I wie die anderen Fette. Die DSC-Untersuchungen zeigen allerdings, dass eine zweite Struktur vorliegen muss, da sich auch hier ein zweites Minimum vor dem eigentlichen Schmelzpeak bildet. Offensichtlich ist diese Struktur jedoch nicht mit SAXD darstellbar.

4.3.4 Schmelzverhalten der gelagerten Proben

Optische Untersuchungen von Lipid-DEET-Gemischen haben gezeigt, dass es im Laufe der Lagerung zu einer Separation von DEET und den Lipidkristallen kommen kann (siehe Kap. 4.3.1). Diese Separation ist ein wichtiger Faktor, der die Eigenschaften der inneren Phase der Suspension beeinflusst. Aus diesem Grund wurden DSC-Untersuchungen an Lipid-DEET-Gemischen durchgeführt, um Aufschluss über das Verhalten der Gemische bei der Lagerung bei Raumtemperatur zu erhalten.

4.3.4.1 DSC-Untersuchungen mit Suppocire C

DSC-Untersuchungen wurden an reinem Suppocire C, sowie an Mischungen, die 10, 20 und 30 % DEET enthielten, durchgeführt. Die Mischungen wurden im Trockenschrank bei ca. 60 °C aufgeschmolzen und anschließend bei 20 °C gelagert.

Die Form der DSC-Kurven variiert leicht je nach Lagerdauer und DEET-Gehalt der Gemische. Abb. 4.20 zeigt das Verhalten von reinem Suppocire C während der Lagerung. Die Veränderungen von Kurvenform und -lage sind minimal und kontinuierlich.

Wird DEET hinzugefügt, ändert sich Form und Lage der Kurven. Wie erwartet verschiebt sich der Schmelzpeak zu niedrigeren Temperaturen. Abb. 4.21 zeigt das Verhalten einer Mischung aus Suppocire mit 30 % DEET. Eine Lagerung von 16 Tagen bewirkt eine leichte Verschiebung der Schmelztemperatur (hier im Minimum des Schmelzpeaks abgelesen) zu höheren Temperaturen. Zusätzlich werden die Peaks ein wenig breiter, woraus eine Verschiebung eines Maximums links von den Schmelzpeaks zu niedrigeren Temperaturen resultiert.

Messungen zu späteren Zeitpunkten zeigten keine weiteren Veränderungen in Kurvenform und -lage. Die Veränderungen der Mischungen sind nach 16 Tagen abgeschlossen.

Ein Vergleich der Minima der Kurven von Mischungen mit unterschiedlichen DEET-Gehalten lässt eine Abhängigkeit von Schmelztemperatur und DEET-Gehalt erkennen. Je mehr DEET einem System zugefügt wird, desto niedriger ist seine Schmelztemperatur. Obwohl nur Trends daraus abgelesen werden können, da Kurvenverschiebungen unter 2 °C nicht signifikant sind, zeigt sich auch bei niedrigeren DEET-Gehalten das gleiche Verhalten wie für Abb. 4.21 beschrieben.

In Abb. 4.22 werden die Schmelztemperaturen abhängig von Lagerdauer und DEET-Gehalt verglichen. Die Schmelztemperatur des reinen Suppocire C steigt langsam und kontinuierlich während des Messzeitraums. DEET senkt die Schmelztemperatur wie erwartet: Ein größerer DEET-Gehalt bewirkt eine niedrigere Schmelztemperatur.

Die Reproduktion der Ergebnisse zeigt, dass sich bei DEET-Gehalten bis 20 % innerhalb des Messzeitraums ein Gleichgewicht in den Proben ausbildet. Die Kurven nähern sich über die Lagerdauer immer weiter aneinander an und laufen spätestens ab einer Lagerdauer von 43 Tagen parallel (bei 0 % DEET sogar schon ab 16 Tagen). Bei einem DEET-Gehalt von 30 % liegen allerdings bis zum Ende der Messungen keine parallelen Kurvenverläufe vor. Es hat sich also in dieser Zeit noch kein Gleichgewicht eingestellt. Die Systeme sind immer noch heterogen, was zu unterschiedlichen Ergebnissen in den Messungen führt.

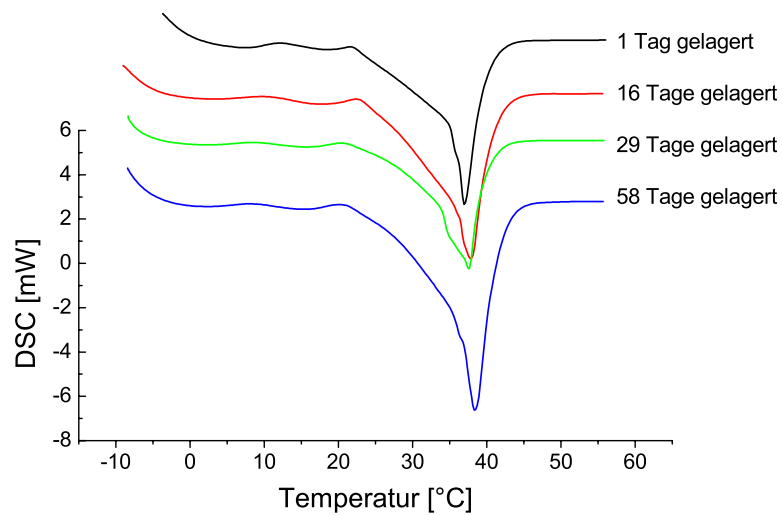


Abbildung 4.20: DSC-Untersuchungen an Suppocire C. Das Fett wurde aufgeschmolzen und bei 20 °C gelagert.

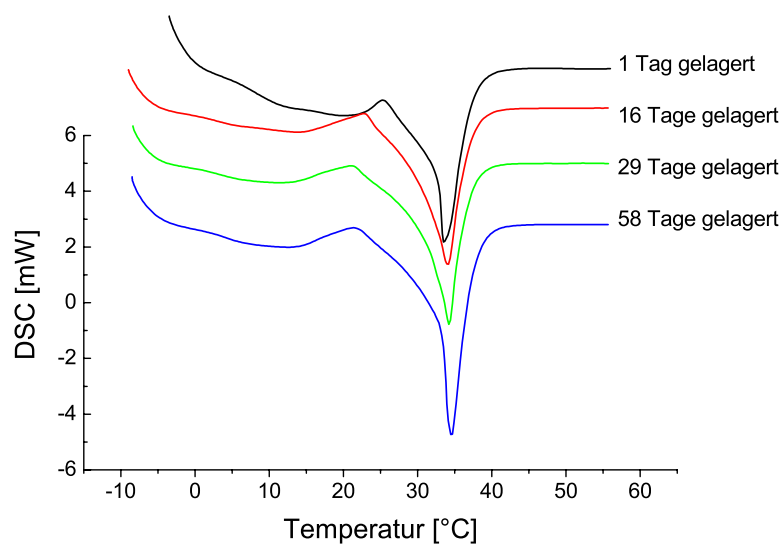


Abbildung 4.21: DSC-Untersuchungen an einer Mischung von Suppocire C und DEET (DEET-Gehalt 30 %). Das Fett wurde aufgeschmolzen und bei 20 °C gelagert.

Die Veränderung der Schmelztemperatur ist bei DEET-haltigen Systemen bis 20 % DEET-Gehalt nach 16 Tagen abgeschlossen. Nach spätestens 43 Tagen hat sich ein Gleichgewicht in den Proben eingestellt. Bei 30 % DEET dauert die Einstellung eines Gleichgewichts in der Probe länger als 58 Tage. Dennoch sind die Veränderungen im Wesentlichen abgeschlossen, da nach einer Lagerdauer von 16 Tagen nur noch kleine Verschiebungen des Schmelzpunkts stattfinden.

4.3.4.2 DSC-Untersuchungen mit Suppocire NA50

Mischungen von DEET und Suppocire NA50 zeigen ein ähnliches Bild. Messungen an reinem aufgeschmolzenem und anschließend bei 20 °C gelagertem Suppocire NA50 wurden ungefähr alle zwei Wochen durchgeführt. Die erste Messung erfolgte am 1. Tag nach Herstellung, die Letzte am 64. Tag. Es wurde reines Suppocire NA50 sowie Mischungen vermessen, die 10, 20 und 30 % DEET enthielten.

Messungen an reinem Suppocire NA50 führen zu Kurven, die ihre Lage nur wenig innerhalb des Messzeitraums verändern (siehe Abb. 4.23). Die größte Veränderung zeigt sich zwischen 1 und 15 Tagen Lagerung. Auch die Form der Kurven ändert sich nur wenig. Nach 15 Tagen verlaufen die Kurven nahezu parallel zur x-Achse und parallel zu einander. Rekristallisation und Umwandlung der Modifikationen scheinen also größtenteils abgeschlossen zu sein.

Die Zugabe von DEET zu dem Lipid verändert wie schon bei Suppocire C die Kurvenform und -lage abhängig vom DEET-Gehalt. Generell weisen die Messungen nach einem Tag Lagerung gestauchte und zu niedrigeren Temperaturen verschobene Kurven auf. Nach einer Lagerzeit von 15 Tagen verändern sich die Kurven nur noch wenig.

Eine Zugabe von 10 % DEET bewirkt noch keine wesentliche Veränderung des Verhaltens der Mischungen im Vergleich zum reinen Lipid (siehe Abb. 4.24). Der breite flache Peak bei ca. 20 °C tritt etwas deutlicher hervor. Dies deckt sich mit den SAXD-Untersuchungen, bei denen sich durch Zugabe von DEET zu Suppocire NA50 ein kleiner zusätzlicher Peak vor dem Reflex I genannten Hauptpeak bildet (siehe Kap. 4.3.3.2), was auf die Bildung einer weiteren Kristallmodifikation hindeutet.

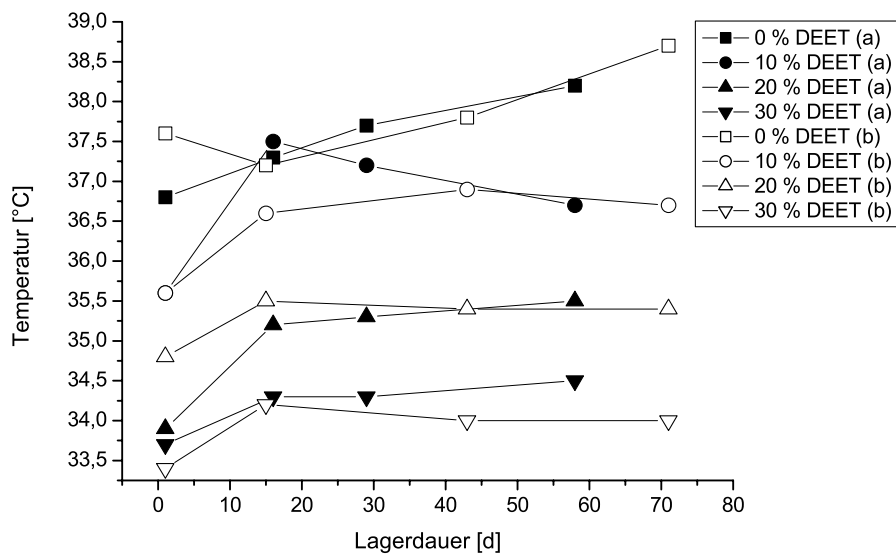


Abbildung 4.22: Veränderung des Schmelzverhaltens von unterschiedlichen Mischungen von Suppocire C und DEET. Die Kurven (a) sind Reproduktionen der Kurven (b).

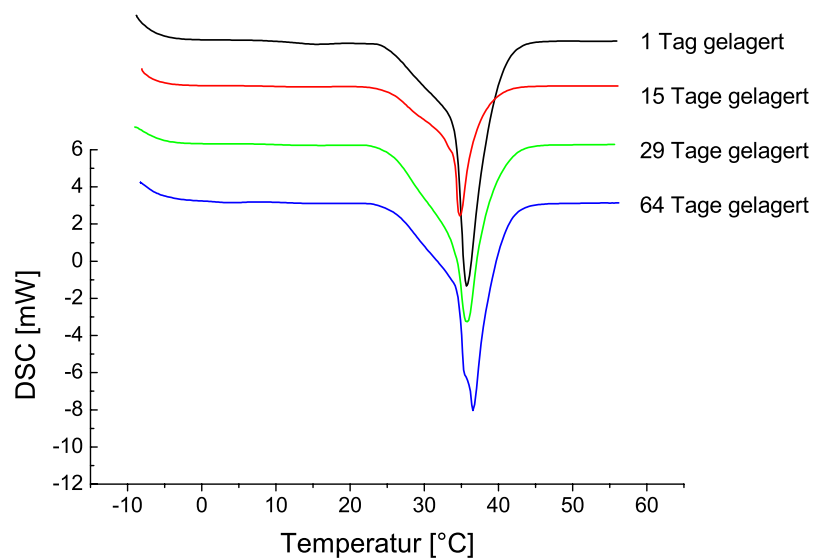


Abbildung 4.23: DSC-Untersuchungen an Suppocire NA50. Das Fett wurde aufgeschmolzen und bei 20 °C gelagert.

Nach 15 Tagen scheint wie bei allen Mischungen von Suppocire NA50 und DEET ein stabiler Zustand erreicht zu sein; Kurvenform und -lage verändern sich nach diesem Zeitpunkt kaum noch. Ab diesem Zeitpunkt verhalten sich auch die Schmelzpunkte identisch mit denen des reinen Lipids.

Abb. 4.25 zeigt einen Vergleich der Messungen von einem Gemisch aus 30 % DEET und Suppocire NA50. Die Kurvenlage verändert sich ab dem 15. Tag nur noch wenig. Anders die Kurvenform: Der recht stark gestauchte Schmelzpeak nach einem Tag Lagerung wird im Laufe der Lagerung schmaler und länger. Ein Maximum links vom Schmelzpeak verschiebt sich kontinuierlich nach rechts zu höheren Temperaturen.

Ein Vergleich der Schmelztemperaturen (wie in Abb. 4.26 dargestellt) zeigt die gleichen Tendenzen, die schon bei den Mischungen von DEET und Suppocire C beobachtet wurden. Die größten Veränderungen finden innerhalb der ersten zwei Wochen der Lagerung statt, nach diesem Zeitpunkt sind die Schwankungen der Schmelztemperaturen nur noch marginal. Die Kurven laufen nach Tag 15 ungefähr parallel und nahezu parallel zur x-Achse, wobei sich die Kurven von reinem Suppocire NA50 und einer Mischung aus Lipid und 10 % DEET überlagern. Zeigen die Messungen nach einem Tag Lagerung noch unterschiedliche Maxima, so verlaufen die Kurven später ungefähr gleich.

Kleine Mengen von DEET verändern also die Struktur des Systems nur kurzfristig. Während der Lagerung verändert sich die Struktur des Systems, bis sie wieder große Ähnlichkeiten mit dem reinen Lipid aufweist. Größere Mengen an DEET verändern die Systeme nachhaltiger, was sich in einer parallelen Verschiebung der Schmelztemperaturkurven verdeutlicht.

4.3.4.3 DSC-Untersuchungen mit Suppocire AM

Schon in Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass Suspensionen mit der Grundlage Suppocire AM nicht stabil sind. Aus diesem Grund wurden nur Lageruntersuchungen an einer Mischung vorgenommen. Beispielhaft wurde eine Mischung von Suppocire AM und 10 % DEET herausgegriffen.

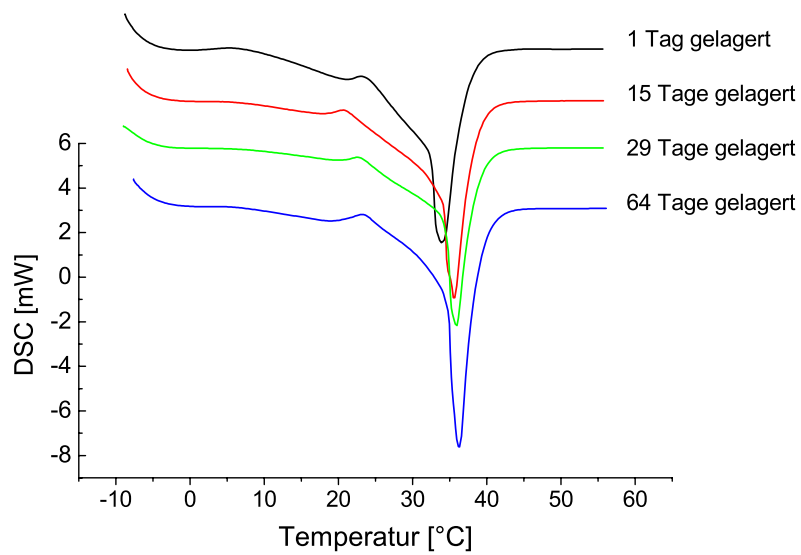


Abbildung 4.24: DSC-Untersuchungen an einer Mischung von Suppocire NA50 und DEET (DEET-Gehalt 10 %). Das Fett wurde aufgeschmolzen und bei 20 °C gelagert.

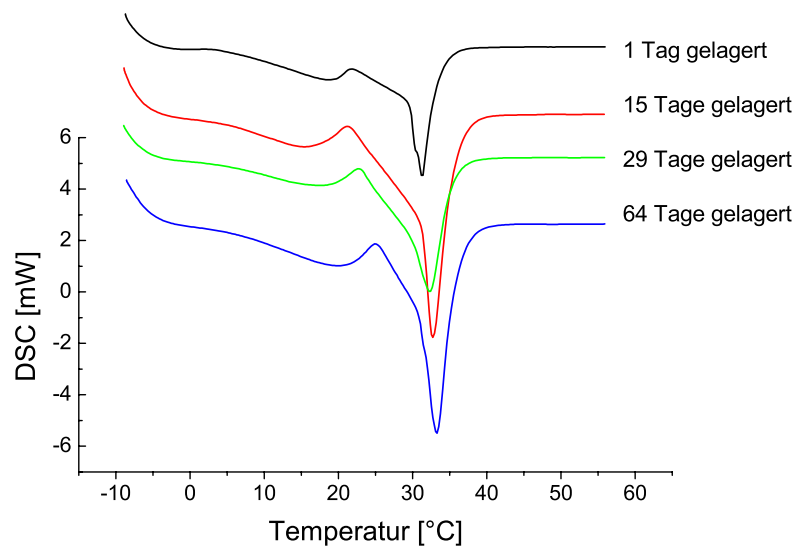


Abbildung 4.25: DSC-Untersuchungen an einer Mischung von Suppocire NA50 und DEET (DEET-Gehalt 30 %). Das Fett wurde aufgeschmolzen und bei 20 °C gelagert.

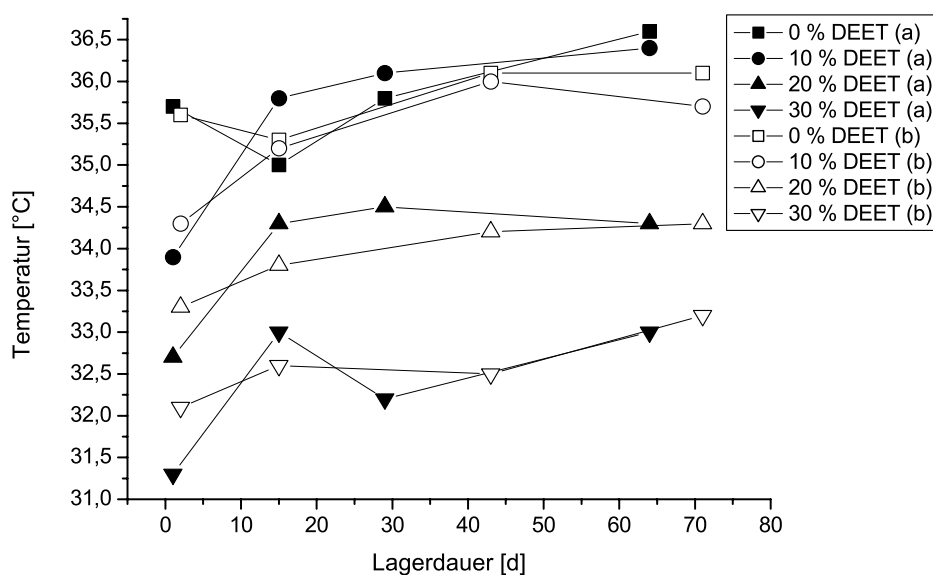


Abbildung 4.26: Veränderung des Schmelzverhaltens von unterschiedlichen Mischungen von Suppocire NA50 und DEET. Die Kurven (a) sind Reproduktionen der Kurven (b).

Die Kurven verändern sich wie in Abb. 4.27 dargestellt kontinuierlich nach der Herstellung der Mischungen. Die Schmelzpeaks werden ausgeprägter und schlanker, der Schmelzpunkt verschiebt sich zu höheren Temperaturen. Der größte Unterschied in der Kurvenform ist zwischen dem ersten und zweiten Messpunkt. Zwischen dem zweiten und dritten Messpunkt ist zwar auch weiterhin ein Unterschied zu erkennen, doch fällt dieser wesentlich geringer aus. Die nächste Veränderung ist noch geringer.

Abb. 4.28 zeigt alle Messungen der Lipid-DEET-Gemische und ihre Reproduktion. Nach 70 Tagen Lagerung sind die Systeme noch nicht im Gleichgewicht. Die Reproduktion zeigt einen sehr unterschiedlichen Kurvenverlauf, was auf heterogene Gemische schließen lässt. Auch wenn die Schmelzpunkte nach 40 Tagen nur noch in geringem Maße schwanken, sind die Veränderungen innerhalb des Systems offensichtlich noch nicht abgeschlossen.

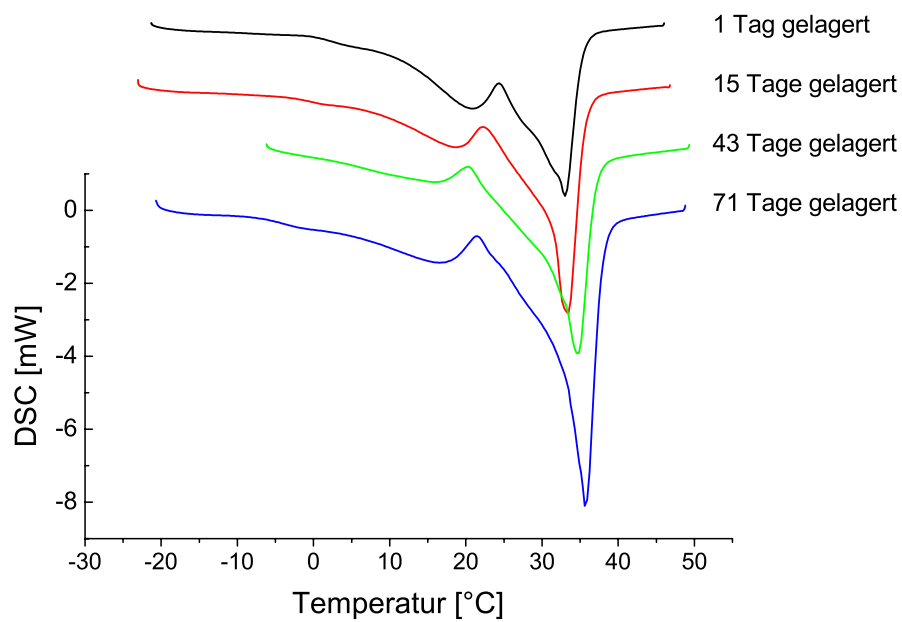


Abbildung 4.27: DSC-Untersuchungen an einer Mischung von Suppocire AM und DEET (DEET-Gehalt 10 %). Das Fett wurde aufgeschmolzen und bei 20 °C gelagert.

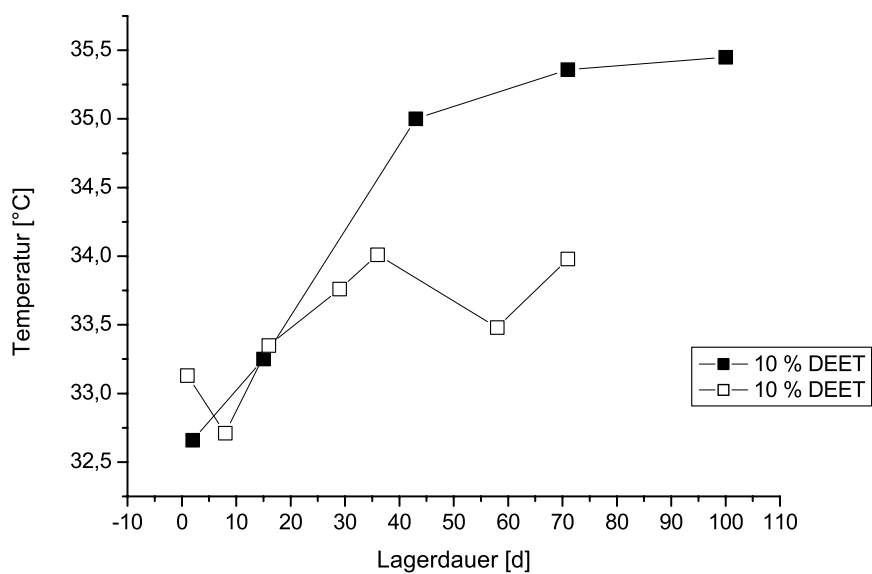


Abbildung 4.28: Veränderung des Schmelzverhaltens einer Mischung von Suppocire AM und DEET und ihre Reproduktion.

4.3.4.4 Fazit der DSC-Untersuchungen

Die Mischungen von DEET und Hartfett haben wie erwartet einen niedrigeren Schmelzpunkt als das reine Hartfett. Durch langsame Umwandlung zwischen den verschiedenen Modifikationen des Hartfettes kommt es zu einer langsamen Erhöhung des Schmelzpunktes während der Lagerung, wobei die Schmelzpunktdepression als solche erhalten bleibt. Die Schmelzkurven laufen ungefähr parallel. Tendenziell kann bei höherem DEET-Gehalt von einem niedrigeren Schmelzpunkt ausgegangen werden.

Die Veränderungen der Mischungen während der Lagerung sind bei den meisten untersuchten Systemen nach ca. 2 Wochen abgeschlossen, was sich in einem konstanten Schmelzpunkt und in parallel verlaufenden Kurvenverläufen bei der Reproduktion zeigt. Ausnahmen sind Mischungen von Suppocire C mit 30 % DEET und Suppocire AM.

4.3.5 NMR

Da die Phasenseparation von Lipid und DEET als wichtiger Faktor für die Instabilität der hypromellosestabilisierten Hartfett suspensionen angesehen wurde, sollten mit zusätzlichen Untersuchungen weitere Aufschlüsse über das Verhalten der Mischungen während der Lagerung gewonnen werden.

NMR-Messungen können in manchen Fällen herangezogen werden, um eine Phasenseparation zwischen Kristallen und Flüssigkeiten zu ermitteln [Jenning et al. 2000].

Zu diesem Zweck wurden Lipid-DEET-Gemische unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt, in dem das Lipid aufgeschmolzen und das DEET mit einem Spatel bis zur Homogenität eingerührt wurde. Nach einem Tag bzw. 4 Monaten Lagerzeit wurden ^{13}C -Spektren von den Gemischen bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen.

Das Spektrum von Suppocire C ohne DEET-Anteil ist in Abb. 4.29 dargestellt. Die Temperatur der Probe zum Zeitpunkt der Messung betrug 295 K. Die Eigenschaften von Suppocire C als Stoffgemisch bewirken, dass auch bei dieser weit unter dem Schmelzpunkt des Fettes liegenden Temperatur klare, scharfe Peaks zu erkennen sind. Hartfette haben je

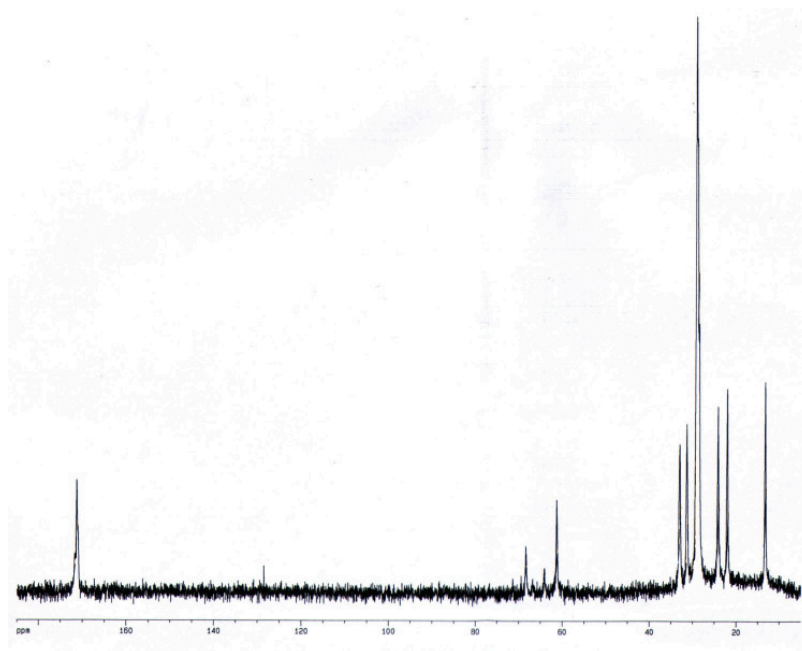


Abbildung 4.29: NMR-Spektrum von Suppocire C, aufgeschmolzen und 1 Tag gelagert. Messtemperatur: 295 K.

nach Zusammensetzung oft keinen festen Schmelzpunkt, da kurzkettige Anteile des Lipids auch bei niedrigen Temperaturen hochbeweglich, also „flüssig“ bleiben (*Solid-Fat-Index*) [Müller et al. 1986]. Im Spektrum sind also weiterhin Peaks zu erkennen, die verschiedenen Molekülgruppen von Triglyceriden zugeordnet werden können.

Ein Spektrogramm von DEET, aufgenommen bei der gleichen Temperatur ist in Abb. 4.30 dargestellt.

Eine Mischung von 30 % DEET und Suppocire C (siehe Abb. 4.31) ergibt ein Spektrum, das sich aus den beiden Einzelspektren zusammensetzt. Die Peaks können den jeweiligen Molekülgruppen von DEET bzw. den Triglyceriden zugeordnet werden.

Das dargestellte Spektrum der Mischung unterscheidet sich praktisch nicht von einem entsprechenden Spektrum, das 4 Monate später von derselben bei 20 °C gelagerten Probe aufgenommen wurde. Einzig die beiden Peaks bei 42 bzw. 38 ppm haben sich ein wenig verändert (siehe Detailausschnitt).

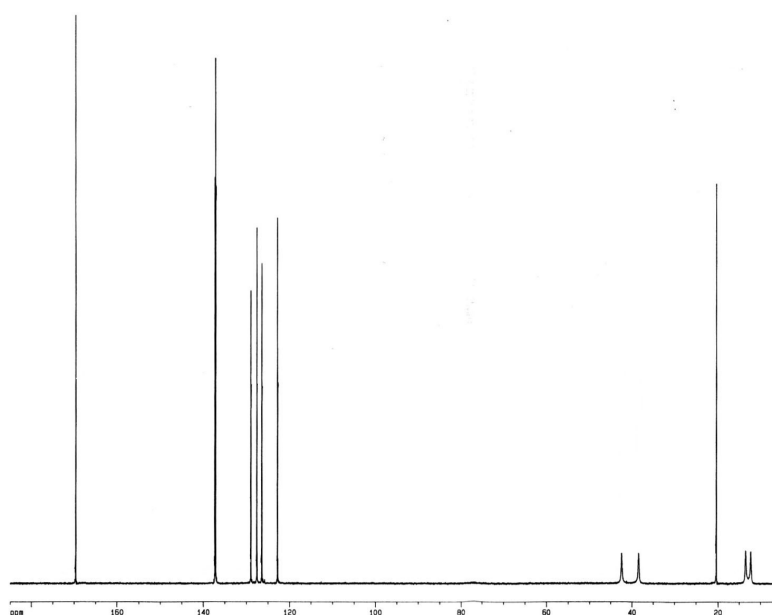


Abbildung 4.30: NMR-Spektrum von DEET. Messtemperatur: 295 K.

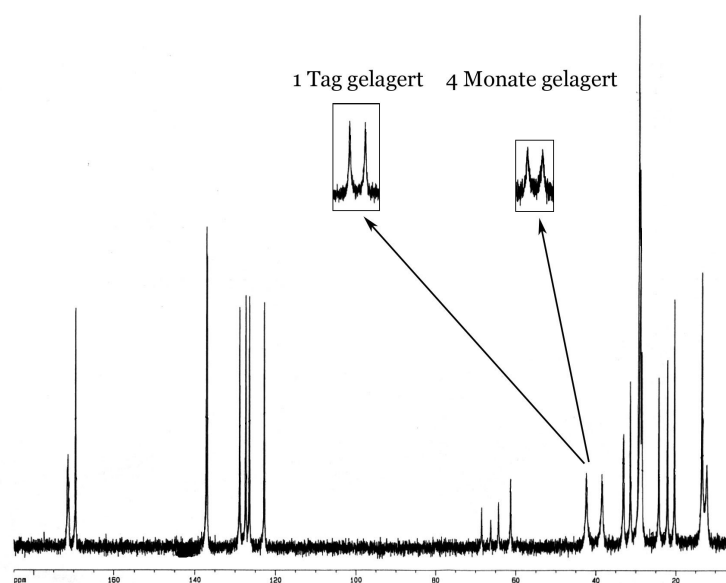


Abbildung 4.31: NMR-Spektrogramm einer Mischung von Suppocire C und 30 % DEET, 1 Tag gelagert (mit Bildausschnitten der 1 Tag und 4 Monate gelagerten Mischung). Die beiden Bildausschnitte wurden nicht vergrößert oder verkleinert. Messtemperatur: 295 K.

Eine weitere Untersuchung der Mischung führte zu Tage, dass eine Temperaturerniedrigung die beiden Peaks klar voneinander trennt. Bei einer Temperatur von 273 K entstehen scharfe, abgegrenzte Peaks bei ca. 42,5 und 38,5 ppm. Eine Temperaturerhöhung auf 307 K hat eine Verbreiterung der Peaks fast bis zur Löschung zur Folge.

Bei den beiden Peaks handelt es sich um Resonanzen der beiden CH_2 -Gruppen an der Amid-Gruppe des DEET. Eine Spaltung in zwei Peaks beruht auf der Tatsache, dass die freie Drehbarkeit des Amidrestes durch Keto-Enol-Tautomerie eingeschränkt ist und die unterschiedliche chemische Umgebung der beiden Reste somit zu verschiedenen Signalen führt. Die Drehbarkeit wird beeinflusst von den vorliegenden intermolekularen und intramolekularen Verhältnissen. Eine erhöhte Beweglichkeit der Moleküle, z. B. durch Lösen aus dem Kristallgitter führt genauso zu einer Veränderung des Spektrums, wie eine Temperaturerhöhung: Die beiden Peaks werden zunächst breiter und nähern sich aneinander an bis sie schließlich zu einem Peak verschmelzen. Die Vermutung, dass auf diese Weise eine Alterung der Probe bestimmt werden könnte, weil eine vermehrte Trennung von DEET und Lipid ähnliche Effekte hat, wie ein Erhitzen der Probe und weil nach Lagerung eine geringe Annäherung der Peaks beobachtet wurde, bestätigte sich jedoch nicht.

Das Spektrum von DEET zeigt zwei scharf voneinander getrennte Peaks. Die Dynamik des Moleküls ist also offensichtlich nicht allein von der Temperatur und dem Alter der Proben abhängig.

Da mit den zur Verfügung stehenden Methoden die Einflussnahme der einzelnen Variablen nicht geklärt werden konnte, wurden weitere Untersuchungen dieser Art eingestellt.

4.4 Verhalten der Suspensionen

4.4.1 Hartfett/Wasser-Verteilungskoeffizient

Um einschätzen zu können, welche Konzentrationen das DEET in der äußeren Phase der Suspensionen erreicht, wurde der Verteilungskoeffizient $P_{Lipid/Wasser}$ bestimmt. Je größer die Affinität des DEET zum jeweiligen Hartfett ist, desto langsamer dampft es bei Anwendung ab. Zusätzlich dient eine hohe Affinität zwischen DEET und Lipid dem Schutz des Körpers, da weniger Wirkstoff mit der Haut in Berührung kommt und dementsprechend weniger absorbiert wird (siehe auch Kap. 4.1.1.2).

Der DEET-Gehalt in der wässrigen Phase ist in Abb. 4.32 abhängig von Hartfett und DEET-Konzentration dargestellt. Jede Probe enthielt 1–3 % DEET und 20 % Lipid. Die genaue Zusammensetzung der Proben ist in Kap. 3.2.4 nachzulesen.

In Abb. 4.33 ist der scheinbare Verteilungskoeffizient $P_{Lipid/Wasser}$ gegen die Gesamt-DEET-Konzentration der Suspension aufgetragen. Da sich die DEET-Hartfett-Mischung unterschiedlich verhält je nachdem wie viel DEET eingesetzt worden ist, muss mit schwankenden Verteilungskoeffizienten gerechnet werden.

Die Werte zeigen jedoch, dass DEET eine höhere Affinität zum Lipid als zum Wasser hat, was die Konzentrationen des mit der Haut oder der Luft in Berührung kommenden Wirkstoffs relativ gering hält.

Aus den Diagrammen lässt sich erkennen, dass die Affinität von DEET zu Suppocire C größer ist als zu den anderen Lipiden. Dies zeigt der große Verteilungskoeffizient. Die Affinität von DEET zu Suppocire NA50 ist am geringsten, während die zu Suppocire AM eine mittlere Position einnimmt. Bei allen drei Fetten ist die Affinität zum Lipid eindeutig größer als zum Wasser.

Obwohl sich DEET und die verschiedenen Hartfette im Laufe der Lagerung trennen können (siehe Kap. 4.3.1), steigt die Affinität des DEET zum Lipid mit zunehmender DEET-Konzentration.

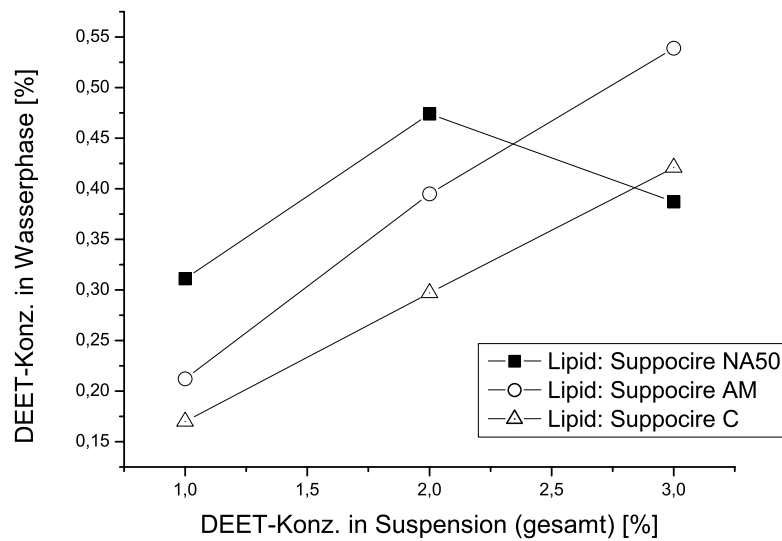


Abbildung 4.32: Gleichgewichtskonzentration von DEET in einem Gemisch aus Aqua dem. und Hartfett aufgetragen gegen den Gesamt-DEET-Gehalt der Suspension. Als Hartfette wurden Suppocire NA50, AM und C eingesetzt.

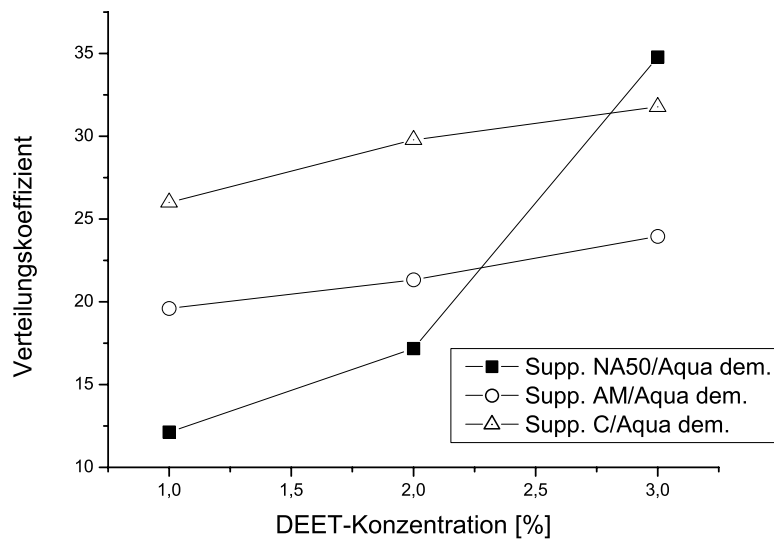


Abbildung 4.33: Verteilungskoeffizient $P_{Lipid/Wasser}$ aufgetragen gegen den Gesamt-DEET-Gehalt in der Suspension. Verwendete Lipide: Suppocire NA50, AM und C

4.4.2 Einfluss der DEET-Konzentration

In allen Versuchen zeigte sich, dass die DEET-Konzentration einen direkten Einfluss auf die Stabilität der Suspensionen hat. Schon eine Konzentration von 1 % DEET verursacht ein Versintern der Lipidpartikel innerhalb weniger Tage. Ein Anteil von 3 % DEET destabilisiert die Suspension derart, dass schon innerhalb des ersten Tages ein Großteil der Partikel versintert. Die verschiedenen Lipide reagieren zwar unterschiedlich auf DEET, aber die Tendenz, dass sich eine Erhöhung der DEET-Konzentration negativ auf die Stabilität auswirkt, zeigt sich in allen Systemen.

4.4.3 Stabilisierung mit Tensiden

Da es nicht gelang DEET-haltige Suspensionen mit einer für eine Wirkung ausreichenden Konzentration herzustellen, wurde in Betracht gezogen sie mit Tensiden zu stabilisieren.

Westesen *et al.* beschreiben einen Zusammenhang zwischen Stabilität und der Verwendung von „schnellen“ oder „langsamen“ Emulgatoren bei der Herstellung von festen Lipid-Nanopartikeln (*solid lipid nanoparticles*, SLN). Bei der Kristallisation von Lipiden entstehen neue Oberflächen, die durch die Emulgatoren stabilisiert werden müssen. Nur „schnelle“ Emulgatoren sind in der Lage die neu entstanden Oberflächen zu stabilisieren, andernfalls reißt die Emulgatorschicht auf und die Partikel können agglomerieren, was zu einer Instabilität des Systems führen kann [Westesen 1993]. Laut Westesen sind vor allem Tenside (ionisch oder nicht-ionisch) dazu in der Lage. Die Emulgatoren liegen typischerweise gelöst vor und lagern sich entweder an Grenzflächen an oder bilden Mizellen, was einen Platzwechsel der Moleküle nur minimal behindert. Bilden die Emulgatoren allerdings eine eigene Phase, reicht die Beweglichkeit nicht mehr aus. Eine Stabilisierung mit „langsamen“ Emulgatoren kann dementsprechend nur durch einen Zusatz von „schnellen“ Emulgatoren erreicht werden.

Dies könnte die beobachteten Instabilitäten erklären, da die angestrebte Form der Beweglichkeit bei Polymeremulgatoren wie der hier verwendeten Hypromellose nicht oder nur sehr eingeschränkt existiert. Es wäre also möglich, dass während der Kristallisation

neu ausgebildete Oberflächen die Emulgatorschicht auf dem Partikel beschädigen und es so zur Aggregation der Partikel kommt und somit eine Versinterung ermöglicht wird.

Es wurden deshalb Versuche unternommen, Suspensionen mit reinem Tensid oder mit einem Gemisch aus Polymer und Tensid zu stabilisieren.

Suspensionen mit Suppocire C als Grundlage und einem Zusatz von 1 % bzw. 2 % Sorbitanstearat (ansonsten die gleiche Zusammensetzung wie oben) waren schon direkt nach der Herstellung makroskopisch inhomogen.

Zu Rezepturen mit 20 % Suppocire AM, 20 % PEG 400, 10 % DEET, 1 % Metolose 4000 (konserviert mit 0,005 % Thiomersal) wurden 0–1,5 g Lecithin zugesetzt. PEG 400 wurde zwischenzeitlich als „Wirkverstärker“ [Bayer AG] eingesetzt und hat keinen Einfluss auf die Stabilität der Suspensionen. Nach einem Tag wiesen nur die Systeme mit 1 g und 1,5 g Lecithin noch individuell vorliegende Partikel auf. Diese Systeme waren allerdings so fest, dass sie für eine praktische Anwendung nicht in Frage gekommen wären, woraufhin auf weitere Untersuchungen verzichtet wurde, obwohl die Stabilität der Systeme insgesamt etwas besser war als die der Systeme, bei denen nur Hypromellose als Stabilisator eingesetzt wurde.

Es konnte also nur bei Lecithinzusatz eine größere Stabilisierung als mit Metolose allein erreicht werden. Die eingesetzten Konzentrationen von Lecithin gingen allerdings über den für die Zielsetzung der Arbeit tolerierbaren Bereich hinaus. Zusätzlich wurde eine sehr starke Verfestigung der Proben beobachtet. Dies kann schon allein ein Grund für die größere Stabilität sein, da natürlich nicht nur der Grenzflächeneffekt der Tenside für die Stabilisierung verantwortlich ist. Die Stabilisierung mit einem Zusatz von Tensiden erscheint aus diesen Gründen für die Arbeit nicht sinnvoll und Untersuchungen in dieser Richtung wurden nicht weiter unternommen. Der von Westesen beobachtete Effekt konnte bei DEET-haltigen Systemen demnach nicht bestätigt werden.

4.4.4 Einfluss der Hypromellose

Suspensionen, die mit Metolose 4000 stabilisiert wurden, waren naturgemäß wesentlich viskoser als solche, die mit Metolose 100 hergestellt wurden – zu viskos um topisch Anwendung zu finden. Mit den folgenden Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob auf Metolose 4000 zu Gunsten von Metolose 100 verzichtet werden kann und welche Unterschiede zwischen den beiden Stabilisatoren bestehen.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Suspensionen mit allen drei Lipiden und unterschiedlichen Konzentrationen von Metolose 100 und 4000 hergestellt (siehe Tab. 4.3) und diese mikroskopisch und makroskopisch in einwöchigem Rhythmus untersucht.

Die DEET-Konzentration von 2 % wurde gewählt, weil sie zur Instabilität der Systeme führt. Auf diese Weise waren Unterschiede in der Stabilität leichter zu erkennen.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Proben zum Vergleich der eingesetzten Metolosen

Substanz	Konzentration [%]	Konzentration [%]
Suppocire C, NA50 oder AM	20	20
Metolose 100	1, 2 oder 3	–
Metolose 4000	–	0,5, 1 oder 2
DEET	2	2
Thiomersal	0,005	0,005
Aqua dem.	ad 100	ad 100

Suppocire AM: Systeme mit 0,5 % Metolose 4000 sind bereits nach einer Woche instabil, durch Aufräumung bildet sich eine feste Fettschicht auf der Probe. Am Grund der Probe befindet sich eine wässrige Schicht. Das gleiche gilt für eine 1%ige Konzentration an Metolose 100.

Mikroskopisch kann bei allen Metolose-Konzentrationen Versinterung von einigen Partikeln erkannt werden. Es bildet sich ein Drei-Phasen-System, in dem das Lipid flüssig in kleinen Tropfen und fest in großen versinterten Kristallen (siehe Abb. 4.45) vorliegt.

Nach zwei Wochen zeigt sich auch bei 2 % Metolose 100 und 1 % Metolose 4000 Aufräumung. Die Systeme mit der jeweils größten Emulgatorkonzentration rahmen im Laufe der 4-wöchigen Untersuchungen aufgrund ihrer hohen Viskosität nicht auf.

Alle Systeme sind zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung dreiphasig (wie in Kap. 4.2 beschrieben). Mikroskopisch kann kein Unterschied in der Stabilität festgestellt werden. Die Metolosen sind also austauschbar.

Suppocire NA50: Schon nach einer Woche sind die Suspensionen mit 0,5 % Metolose 4000 bzw. 1 % Metolose 100 aufgeräumt (wie für Suppocire AM beschrieben). Versintierung kann nach einer Woche bei keiner der Proben beobachtet werden. Nach zwei Wochen Lagerung zeigen die Suspensionen mit höheren Metolose-Konzentrationen eine Versintierung der Partikel, aber keine Aufräumung. Auch nach vier Wochen ist keine Aufräumung festzustellen. Wie bei der Verwendung von Suppocire AM zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Metolosen.

Suppocire C: Suspensionen mit Suppocire C verhalten sich wie Systeme mit Suppocire NA 50. Auch hier zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Metolosen.

Fazit: Makroskopisch beobachtete Unterschiede in der Stabilität sind höchstwahrscheinlich auf die höhere Viskosität der Systeme mit Metolose 4000 zurückzuführen. Mikroskopisch kann kein Unterschied in der Stabilität festgestellt werden. Die Versuche zeigen also, dass in den weiteren Untersuchungen auf Metolose 4000 zu Gunsten von Metolose 100 verzichtet werden kann.

4.4.5 Abkühlvorgang

Die untersuchten Suspensionen sind direkt nach der Herstellung sowie einige Zeit nach der Abkühlung makroskopisch stabil. Instabilitäten treten erst später auf. Aus diesem Grund

wurde das Verhalten der Suspensionen bei der Abkühlung unter dem Polarisationsmikroskop beobachtet. Zu diesem Zweck wurde ein Tropfen der frisch hergestellten Suspension auf einen vorgeheizten Objektträger aufgebracht und mit einem Heiztisch die Temperatur um 2 °C/min verringert. Alle 2,5 min wurde eine Aufnahme gemacht. Die Untersuchungen wurden ausschließlich mit Suppocire C und Suppocire AM durchgeführt, da sich Suppocire C und Suppocire NA50 ungefähr gleich verhalten (siehe Kap. 4.4.7). Die Suspensionen wurden mit unterschiedlichen DEET-Konzentrationen (siehe Tab. 4.4) hergestellt. Die Heizrate, die Start- und die Endtemperatur der Messungen ist Tab. 4.5 zu entnehmen.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der Suspensionen, die für die Beobachtung des Abkühlvorgangs herangezogen wurden.

Substanz	Konzentration [%]
Suppocire C / Suppocire AM	20
DEET	0, 3 oder 5
Metolose 100	2
Thiomersal	0,005
Aqua dem.	ad 100

Tabelle 4.5: Anfangs- und Endtemperatur und Heizrate

Anfangstemperatur	40 °C
Endtemperatur	10 °C
Heizrate	-2 °C/min

Die Proben zeigen während des Abkühlvorgangs noch keine Tendenz zur Versinterung. Nach anfänglicher hoher Beweglichkeit der Partikel auf dem Objektträger, nehmen die Bewegungen auf dem Objektträger mit sinkender Temperatur ab, um schließlich ganz zum Stillstand zu kommen. Die Kristallisation des Fettes wurde mit dem Polarisationsfilter des Mikroskops sichtbar gemacht.

Die erwartete Kristallisation des Fettes lässt sich in den meisten Proben gut erkennen. Wie man allerdings beispielhaft in Abb. 4.34 sieht, ist die Ausbildung kristalliner Strukturen nur bei großen Partikeln sichtbar. Im Laufe der Lagerung ist eine Zunahme der kristallinen Anteile in allen Fällen zu beobachten.

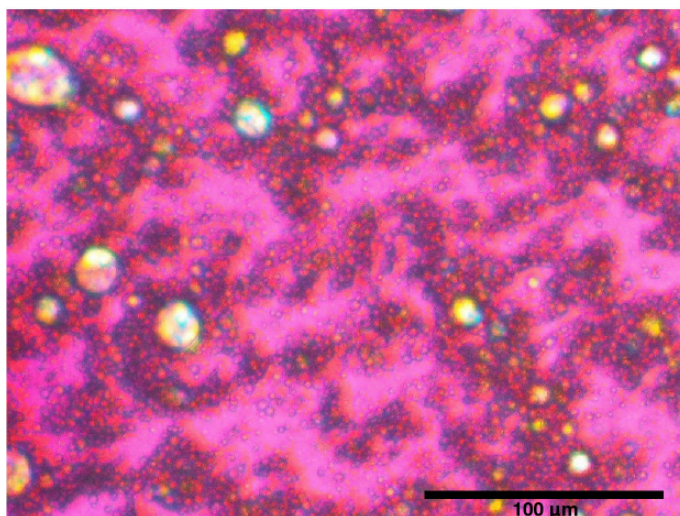


Abbildung 4.34: Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer Suspension mit Suppocire C und 5 % DEET kurz nach der Herstellung; Temperatur 11 °C. Kristallisierte Partikel sind als helle Flächen zu erkennen. (Grenzen in der Auflösung der Kamera verhindern ein klareres Bild.)

Bei der Abkühlung bildet sich zunächst eine unterkühlte Schmelze. Den kleinen Partikeln fehlt vermutlich der Kristallisationskeim und sie kristallisieren dementsprechend erst nach Lagerung. Westesen und Bunjes [Westesen und Bunjes 1995] beschreiben ein ähnliches Phänomen bei der Herstellung von festen Lipidnanopartikeln, bei dem die Partikel auch bei Temperaturen weit unter dem Gefrierpunkt und auch bei längerer Lagerung nicht auskristallisieren. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um ein vergleichbares Phänomen.

Die Agglomeration der Partikel ist hingegen schon während des Abkühlvorgangs zu erkennen. In fast allen Proben (mit Ausnahme der Suspension mit Suppocire C und 3 % DEET) ist deutlich zu sehen, dass die Agglomeration der Teilchen von der Temperatur abhängt und wahrscheinlich vom DEET-Gehalt beeinflusst wird. Die Proben mit Suppocire AM als Grundlage liefern ein sehr deutliches Ergebnis: Abb. 4.35 zeigt eine Suspension bei einer Temperatur von 10 °C ohne DEET-Zusatz; es ist keine Agglomeration zu erkennen. Bei einer Suspension mit einem DEET-Gehalt von 3 % ist ab einer Temperatur von 20 °C eine Agglomeration der Teilchen zu beobachten, bei einer Erhöhung des DEET-Gehalts auf 5 % ist schon zu Beginn der Messung eine Agglomeration zu erkennen (siehe Abb. 4.36). Sus-

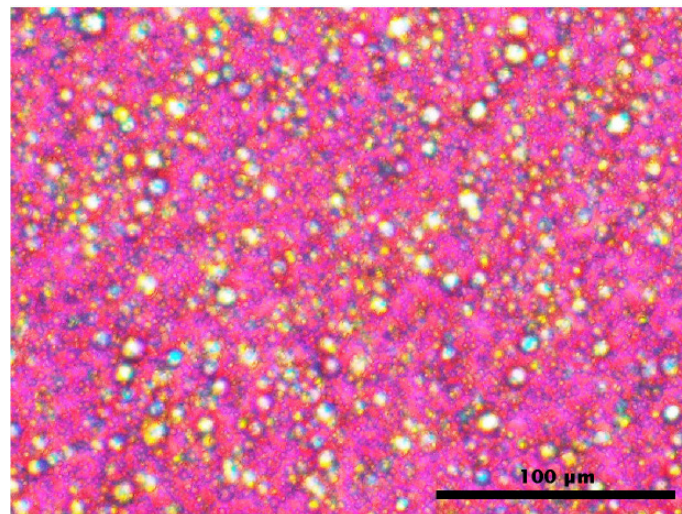


Abbildung 4.35: Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer Suspension mit Suppocire AM und 0 % DEET kurz nach der Herstellung; Temperatur 10 °C. Kristallisierte Partikel sind als helle Flächen zu erkennen. (Grenzen in der Auflösung der Kamera verhindern ein klareres Bild.)

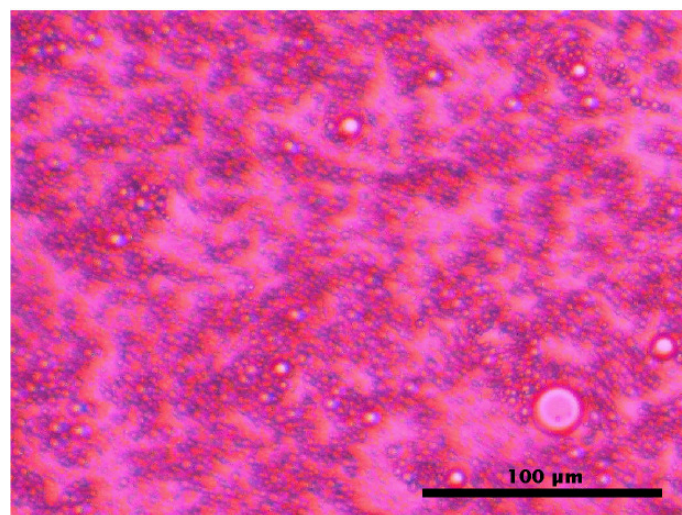


Abbildung 4.36: Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer Suspension mit Suppocire AM und 5 % DEET kurz nach der Herstellung; Temperatur 40 °C (Aufnahme wegen hoher Teilchenbewegung etwas verschwommen).

pensionen mit Suppocire C als Grundlage liefern ein weniger deutliches Ergebnis, aber auch bei diesen Proben ist zu erkennen, dass Temperatur und DEET-Gehalt die Agglomeration beeinflussen.

Bei keiner der Proben war eine Versinterung während des Abkühlvorgangs zu beobachten, der Versinterungsprozess ist also nicht ausschließlich temperaturabhängig. Die Zeit ist als zweiter Faktor in den Vorgang mit einzubeziehen.

4.4.6 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

4.4.6.1 Suspensionen

Zusätzlich zu Lipid-DEET-Mischungen wurden DEET-haltige Suspensionen 1–6 h nach der Herstellung präpariert und mit einem TEM untersucht. Als Probenpräparation wurden Gefrierschnitte durchgeführt, die bei dispersen Systemen wesentlich wirklichkeitsgetreue Präparate liefern als Gefrierbrüche. Gefrierschnitte liefern eine recht glatte Oberfläche, die auch durch Partikel hindurchgeht, wobei Gefrierbrüche dazu neigen an Orten des geringsten Widerstands, also innerhalb der äußeren Phase, zu brechen.

Wie Abb. 4.37 beispielhaft zeigt, konnten die Partikel der inneren Phase auf diese Weise dargestellt werden. Der zentrale, ca. 1 μm große Partikel lässt eine Schichtstruktur erkennen, die bei anderen Partikeln nicht wiederzufinden ist. Ob es sich bei den anderen, kleineren Partikeln um DEET-haltige Lipidkristalle oder vielleicht um DEET-Tropfen handelt, die außerhalb der Fettphase im Wasser vorliegen, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, die Strukturen sind dazu nicht deutlich genug.

4.4.7 Teilchengrößenuntersuchungen

Mithilfe des LS 13 320 *Particle Size Analyzers* der Firma Beckmann Coulter wurden Messungen der Partikelgrößen in gelagerten Suspensionen durchgeführt. Eine optische Untersuchung der Proben fand parallel zu den Messungen am PIDS-Gerät statt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

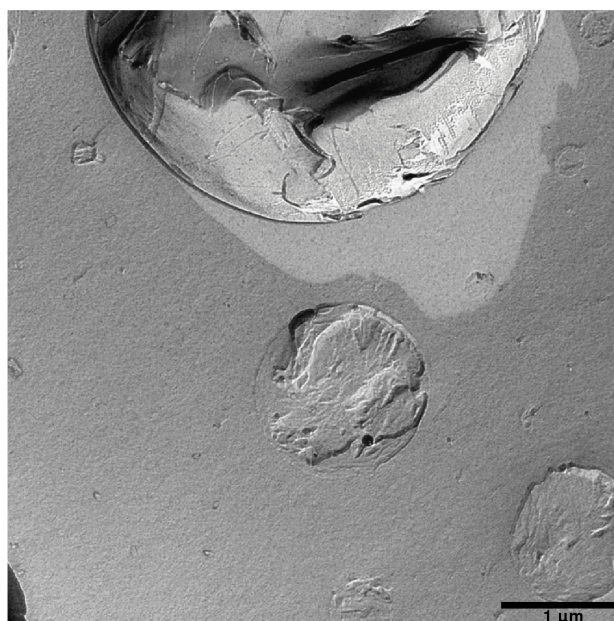


Abbildung 4.37: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Suspension 3 h nach der Herstellung (20 % Suppocire NA50, 10 % DEET, 2 % Metolose 4000, 68 % Aqua dem., konserviert mit 0.005 % Thiomersal). Der Balken entspricht 1 μm .

Suspensionen basierend auf allen drei verwendeten Hartfetten wurden mit unterschiedlichen DEET-Konzentrationen hergestellt und die Partikelgrößen über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet. Die genaue Zusammensetzung der Proben ist in Tab. 4.6 zu finden.

Die in Kap. 3.2.1 beschriebene Vorgehensweise bei der Probenaufbereitung hatte sich zuvor als notwendig erwiesen, um eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Da die Apparatur mit verdünnten Proben arbeitet, die gleichmäßig im Messvolumen verteilt sein müssen, ist es bei den Suspensionen unabdingbar, ein wenig vorzuhomogenisieren, da die Partikel stark zu Agglomeration neigen und der Rührer im Gerät nicht ausreicht, um die Partikel gleichmäßig zu verteilen. Erschwerend kam hinzu, dass die Suspensionen teilweise nur schlecht in den Probenraum gegeben werden konnten, wenn auf eine vorherige Verdünnung verzichtet wurde.

Probenbezeichnung	Hartfett	DEET	Metolose 100	Aqua dem.
AM_0%	20 % Suppocire AM	0 %	2 %	q. s.
AM_1%	20 % Suppocire AM	1 %	2 %	q. s.
AM_2%	20 % Suppocire AM	2 %	2 %	q. s.
AM_3%	20 % Suppocire AM	3 %	2 %	q. s.
C_0%	20 % Suppocire C	0 %	2 %	q. s.
C_1%	20 % Suppocire C	1 %	2 %	q. s.
C_2%	20 % Suppocire C	2 %	2 %	q. s.
C_3%	20 % Suppocire C	3 %	2 %	q. s.
C_4%	20 % Suppocire C	4 %	2 %	q. s.
NA50_0%	20 % Suppocire NA50	0 %	2 %	q. s.
NA50_1%	20 % Suppocire NA50	1 %	2 %	q. s.
NA50_2%	20 % Suppocire NA50	2 %	2 %	q. s.
NA50_3%	20 % Suppocire NA50	3 %	2 %	q. s.
NA50_4%	20 % Suppocire NA50	4 %	2 %	q. s.

Tabelle 4.6: Partikelgrößenmessung mit dem PIDS-Gerät: Zusammensetzung der Proben. Alle Proben wurden mit 0,005 % Thiomersal konserviert.

Allerdings sollte die notwendige Scherung die Partikel nicht beschädigen, weshalb eine völlige Trennung der Partikel nicht erreicht werden konnte.

Ziel der Messungen war die Ermittlung der Größe der vorliegenden Agglomerate, um auf diese Weise eine Aussage über die Agglomerationsneigung der Systeme machen zu können. Die mikroskopischen Aufnahmen vorhergehender Untersuchungen hatten bereits ergeben, dass Agglomeration und Versinterung der Partikel die Stabilität der Proben wesentlich stärker beeinflussen als das Wachstum von Primärpartikeln.

4.4.7.1 Suspensionen mit Suppocire C

In Abb. 4.38 ist ein Diagramm der volumenbezogenen Partikelgrößenverteilung einer einen Tag gelagerten Suspension zu sehen. Die beiden Maxima liegen bei 1,5 bzw. 21,7 μm (siehe Kap. 3.2.7).

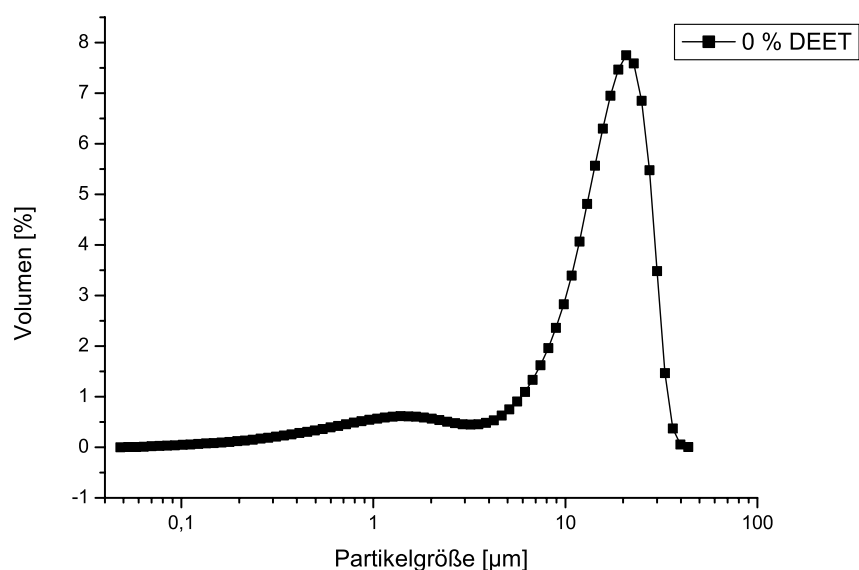


Abbildung 4.38: Partikelgrößenverteilung einer Suspension (0 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 Tag gelagert.

Ein Vergleich der Partikelgrößenverteilungen nach einer Lagerung von einem Tag (siehe Abb. 4.39) zeigt, dass die Partikelgröße vom DEET-Gehalt der Suspension abhängt. Der Modalwert der Kurven liegt zwischen 22 μm bei 0 % DEET und 38 μm bei 4 % DEET-Gehalt.

Nach 7 Tagen Lagerung (siehe Abb. 4.40) liegen die Partikelgrößen weiter auseinander. Der Modalwert liegt zwischen 15 und 46 μm . Die Suspension mit 0 % DEET zeigt eine Linksverschiebung der Kurve; 4 % DEET bewirken eine Rechtsverschiebung der Kurve während der Lagerung.

Als Interpretationshilfe der Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen wurden die vermessenen Suspensionen mit einem Polarisationsmikroskop betrachtet. Damit eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Partikelgrößenanalyse gegeben ist, wurden zu diesem Zweck die vorhomogenisierten Suspensionen verwendet.

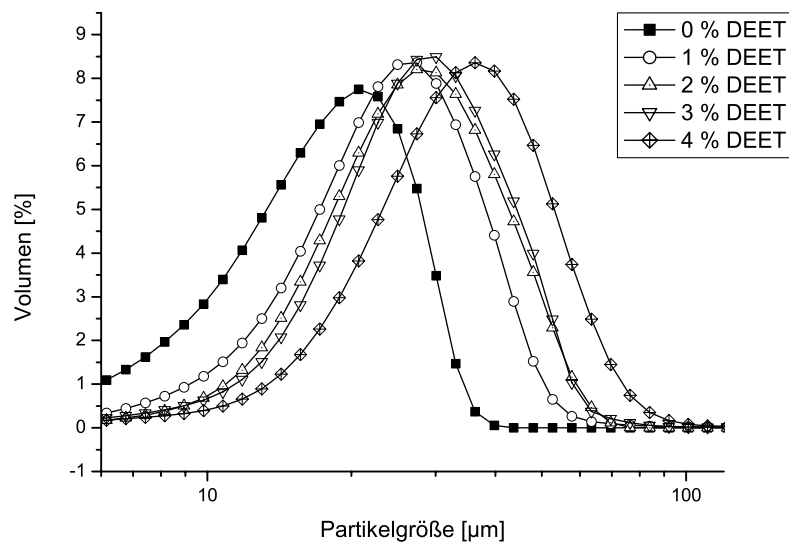


Abbildung 4.39: Partikelgrößenverteilung verschiedener Suspensionen (0–4 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 74–78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 Tag gelagert (Kurvenausschnitt).

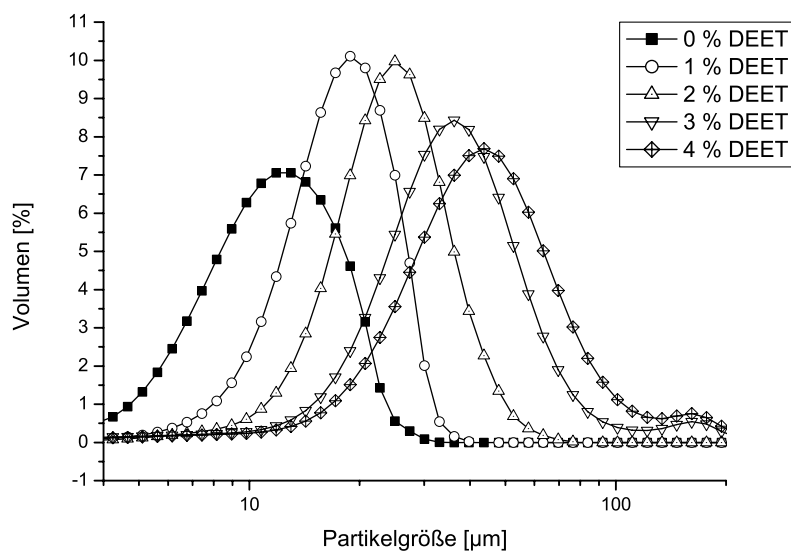


Abbildung 4.40: Partikelgrößenverteilung verschiedener Suspensionen (0–4 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 74–78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 7 Tage gelagert (Kurvenausschnitt).

Die Untersuchung mit dem Polarisationsmikroskop verdeutlicht die Ergebnisse der oben dargestellten Kurven. Nach einem Tag Lagerung sind viele der Partikel agglomeriert (siehe Abb. 4.41 links). Es ist zu erkennen, dass der Grad der Agglomeration vom DEET-Gehalt der Suspension abhängt. Die Partikel haben ihre Individualität allerdings noch nicht verloren.

Nach sieben Tagen Lagerung (siehe Abb. 4.41 rechts) haben viele Partikel ihre Individualität bereits verloren. Der Individualitätsverlust ist abhängig vom DEET-Gehalt: Ein niedriger DEET-Gehalt von 0 oder 1 % bewirkt nur geringe Veränderungen während der Lagerung. Die Größe der einzelnen Partikel verändert sich nur sehr wenig innerhalb dieses Zeitraums, nur die Agglomerate verändern ihre Größe (s. u.). Bei größeren DEET-Gehalten – hier beispielhaft 4 % dargestellt – kommt es zu einer Versinterung der Partikel und somit zu einem Anwachsen der Partikelgröße, wie auch im Diagramm der Partikelgrößenmessung zu sehen ist (siehe Abb. 4.40).

Bei ca. 170 μm zeigen einige der Kurven eine kleine Schulter. Diese Schulter ist ein Anzeichen für vom Vorhomogenisierungsprozess weniger zerkleinerte versinterte Partikel. Die Größe der Schulter ist also ein weiteres Anzeichen für den Grad der Instabilität der Proben.

Betrachtet man das Verhalten der Proben über die Zeit (siehe Abb. 4.42 und 4.43), stößt man auf ein interessantes Phänomen: Bei geringen DEET-Gehalten von 0 und 1 % kommt es im Laufe der Zeit zu einer Verkleinerung der gemessenen Partikelgrößen. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen keine sichtbare Verkleinerung der Primärpartikel, es ist allerdings eine Desagglomeration zu erkennen (s. o.). Auch dieses Phänomen ist abhängig vom DEET-Gehalt der Systeme: Suspensionen mit 0 % DEET zeigen eine relativ starke Abnahme der Partikelgröße der gemessenen Partikel. Die Veränderung ist bei einem DEET-Gehalt von 1 % geringer (nicht dargestellt) und kommt bei 2 % DEET zum Stillstand. Größere DEET-Konzentrationen bewirken immer ein Partikelwachstum.

Das Auskristallisieren der Fettphase führt zur Agglomeration der Partikel, wobei sich die Verbrückung während der Lagerung langsam wieder löst (höchstwahrscheinlich durch die Veränderung der Lipidphase). Agglomerate verlieren deshalb nach und nach ihre Festigkeit und Partikel lösen sich davon. Bei der Anwesenheit von DEET im System versintern die Partikel zeitgleich, wobei ein erhöhter DEET-Gehalt eine beschleunigte Versinterung

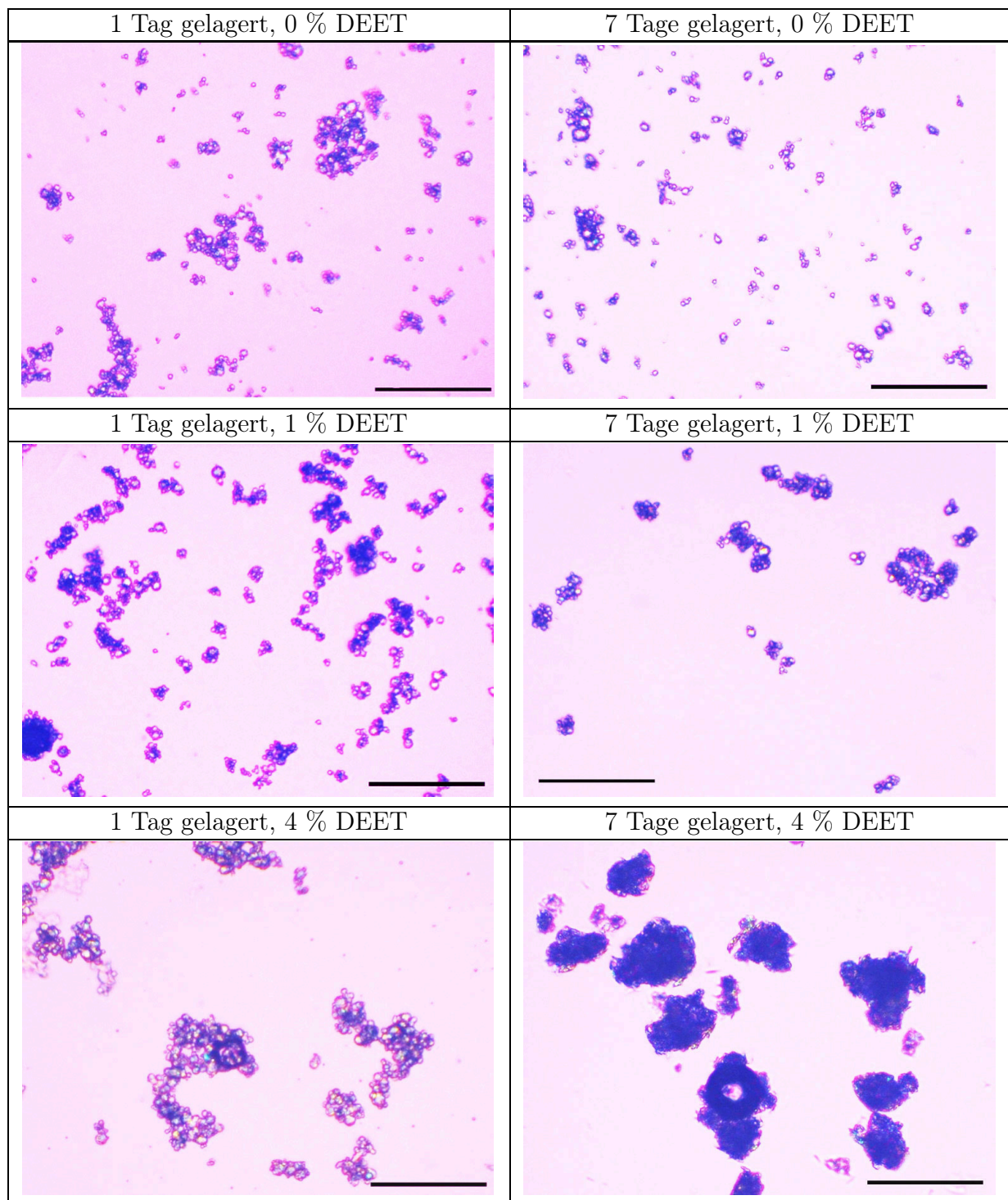


Abbildung 4.41: Polarisationsmikroskopische Darstellung von verschiedenen Suspensionen (0–4 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 74–78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal). Der Balken entspricht jeweils 100 μm .

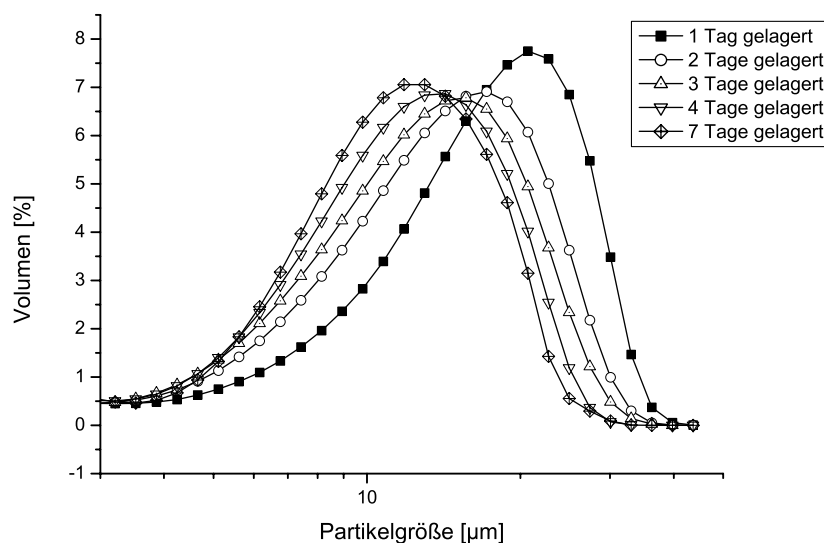


Abbildung 4.42: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (0 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 bis 7 Tage gelagert (Kurvenausschnitt).

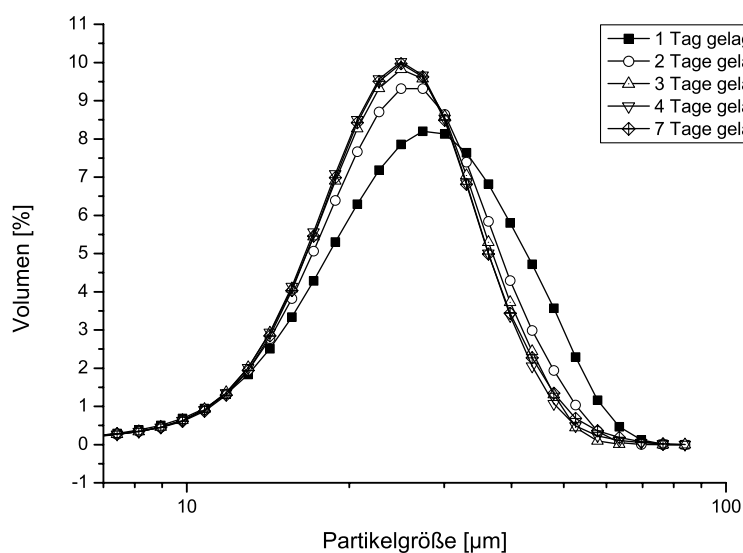


Abbildung 4.43: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (2 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 76 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 bis 7 Tage gelagert (Kurvenausschnitt).

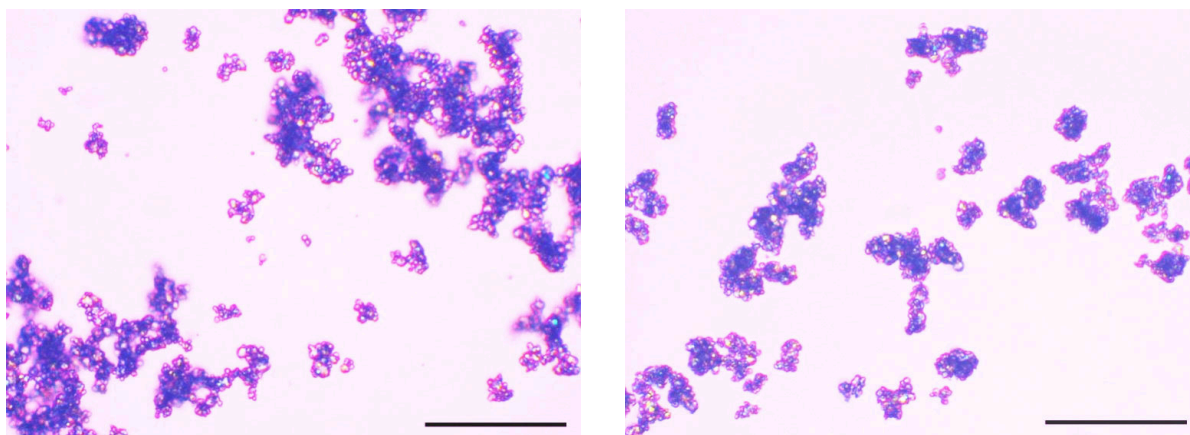


Abbildung 4.44: Polarisationsmikroskopische Darstellung einer Suspension (2 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 76 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal). Links: 1 Tag gelagert; rechts: 7 Tage gelagert. Der Balken entspricht jeweils 100 μm .

bewirkt. Bei Konzentrationen von 3 und 4 % DEET kommt es deshalb zu einem Anwachsen der Partikelgröße. Im Grenzbereich bei 2 % DEET findet die Versinterung nicht schnell genug statt, um im Messzeitraum ein Anwachsen der Partikel zu verursachen. Ein Vergleich von polarisationsmikroskopischen Aufnahmen von Suspensionen mit 2 % DEET und einer Lagerdauer von 1 und 7 Tagen (siehe Abb. 4.44) zeigt, dass die Agglomerate nicht angewachsen sind, aber eine stärkere Versinterung aufweisen. Bei längerer Lagerung kommt es auch bei dieser DEET-Konzentration zu einer Zerstörung der Suspension, da die Versinterung weiter fortschreitet (s. Kap. 4.2).

Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt. Die Reproduktionen der Messungen weisen die gleichen Tendenzen auf (mit zwei Ausnahmen) wie die ursprünglichen Messungen. Die Modalwerte der Kurven der Reproduktionen weisen mit ganz wenigen Ausnahmen Unterschiede von maximal 4 μm auf, was je nach Größenbereich, in dem man sich bewegt, 2–3 Kanälen in der Messapparatur entspricht. Wenngleich aufgrund der heterogenen Proben kein identisches Resultat erreicht wird, bestätigt die Wiederholungsmessung die grundsätzliche Aussage der ersten Messung.

Abweichend davon zeigt ein Vergleich aller Messungen mit einer Lagerdauer von einem Tag (0–4 % DEET) bei einer der beiden Versuchsreihen keine gleichmäßige Verringerung des Modalwerts der Partikelgrößen. Auch ein Vergleich aller Suspensionen mit einem

DEET-Gehalt von 4% zeigt eine Abweichung bei einer der beiden Messreihen. Beide Messreihen zeigen dennoch die Tendenz, dass eine lange Lagerdauer und ein großer DEET-Gehalt zu großen Partikel führen, auch wenn in diesen Ausnahmefällen, die Reihenfolge der benachbarten Kurven teilweise vertauscht wurde. Sie können also als Ausnahmen betrachtet werden.

Die Ergebnisse bestätigen also, dass hypromellosestabilisierte Suspensionen mit einer Lipidphase aus Suppocire C eine unterschiedliche Stabilität in Abhängigkeit vom DEET-Gehalt aufweisen, wie dies schon in Vorversuchen beobachtet werden konnte. Bei der Kristallisation des Fettes nach der Herstellung kommt es zur Flockung der Partikel. Ein DEET-Gehalt von bis zu 1 % bewirkt eine Lockerung der Agglomerate innerhalb von einer Woche, was zu einer effektiven Verkleinerung der gemessenen Partikelgrößen führt. Bei 2 % DEET-Gehalt bleibt die Partikelgröße gleich, obwohl es zu einer Umstrukturierung der Partikel kommt. Ein größerer DEET-Gehalt fördert eine Versinterung der Partikel in einem Maße, dass es zu einem Anwachsen der Partikel innerhalb des Messzeitraums kommt.

Suspensionen mit einem DEET-Gehalt von bis zu 1 % sind über einen längeren Zeitraum als eine Woche stabil.

4.4.7.2 Suspensionen mit Suppocire AM

Partikelgrößenmessungen mit Suspensionen auf der Basis von Suppocire AM zeigen bei Lagerung ein anderes Verhalten als die oben beschriebenen auf der Basis von Suppocire C. Während der Lagerung bilden sich durch Versinterung große feste Partikel. Neben diesen Partikeln liegt eine dritte Phase aus kleinen Fetttropfen vor. Abb. 4.45 zeigt dieses Verhalten am Beispiel von einer 4 Tage gelagerten Suspension mit einem DEET-Gehalt von 1 %.

Da die Form der versinterten Partikel sehr unterschiedlich ist, wirkt sich der Vorhomogenisierungsprozess, mit der die Proben vorbehandelt wurden, unterschiedlich auf die Proben aus, was zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen bei den Messungen führte. Abb. 4.46 bis 4.49 zeigen die Veränderung der unterschiedlichen Suspensionen (0–3 % DEET) über einen

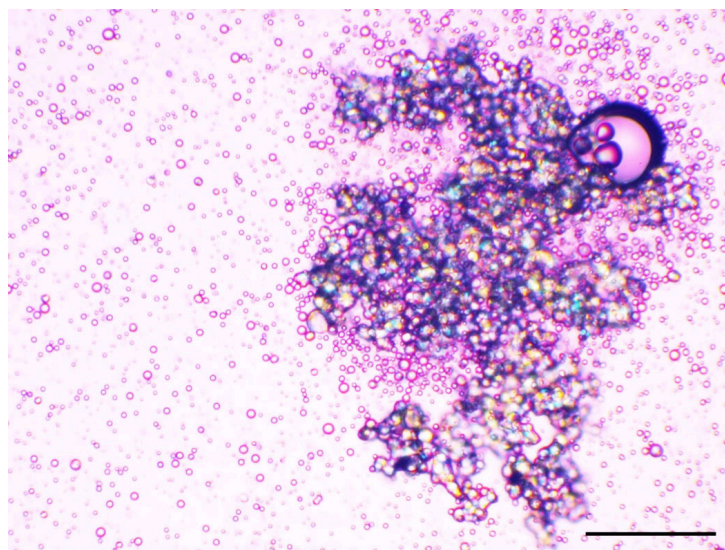


Abbildung 4.45: Polarisationsmikroskopische Darstellung einer Suspension (1 % DEET, 20 % Suppocire C, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 75 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 4 Tage gelagert. Der Balken entspricht 100 μm .

Lagerzeitraum von 7 Tagen. Da sich schon im Vorfeld herausgestellt hat, dass Suppocire AM keine stabilen Suspensionen über einen längeren Zeitraum als 2 Tagen ergibt, wurde auf Suspensionen mit einer DEET-Konzentration von 4 % verzichtet.

Die Graphiken zeigen meist multimodale Zusammensetzungen der Proben und häufig ein Anwachsen der Anzahl an großen Partikeln über die Zeit, was dem optisch beobachteten Verhalten der Proben entspricht. Generell lässt sich aus den Graphiken sehen, dass Lagerdauer und DEET-Gehalt einen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung haben, wobei lange Lagerdauer und hoher DEET-Gehalt zu großen Partikeln führen.

Die Reproduzierbarkeit erwies sich als schlechter als bei Proben mit Suppocire C. Ein Grund hierfür ist die unregelmäßige Form der kristallisierten Partikel, die aus der Versinterung resultiert. Dies führt nicht nur zu einer inhomogenen Verteilung der Partikel im System, sondern bietet auch unterschiedliche Angriffspunkte für eine Scherung während des Vorhomogenisierungsprozesses. Beides findet sich in recht unterschiedlichen Kurvenverläufen wieder, wenn das gleiche System mehrere Male vermessen wird. Andererseits kann beim Auftrag der Probe in die Messküvette nicht gewährleistet werden, dass die Partikel völlig homogen in der Verdünnung verteilt sind. Bei der Anwesenheit von großen Fettkristallen

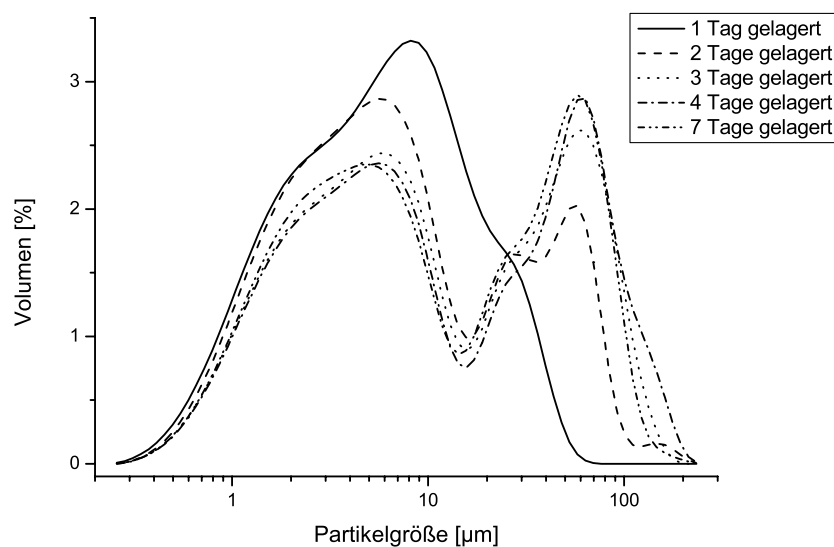


Abbildung 4.46: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (0 % DEET, 20 % Suppocire AM, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 bis 7 Tage gelagert.

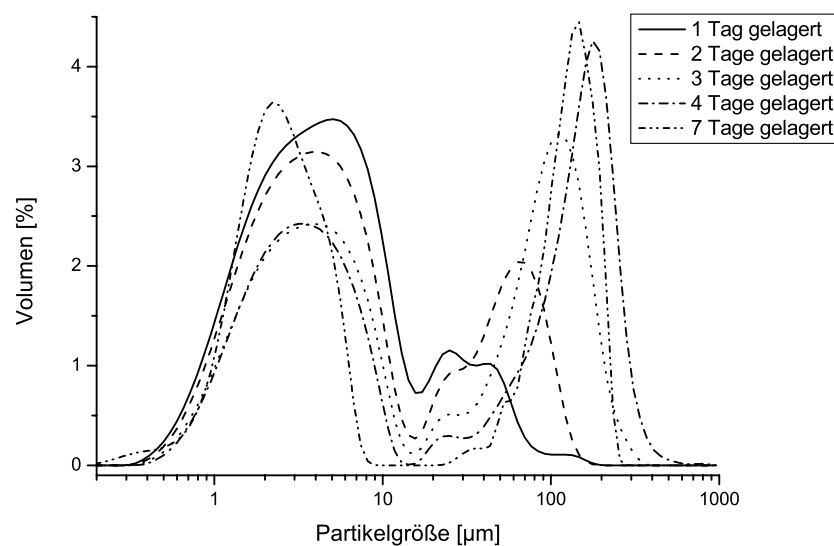


Abbildung 4.47: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (1 % DEET, 20 % Suppocire AM, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 77 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 bis 7 Tage gelagert.

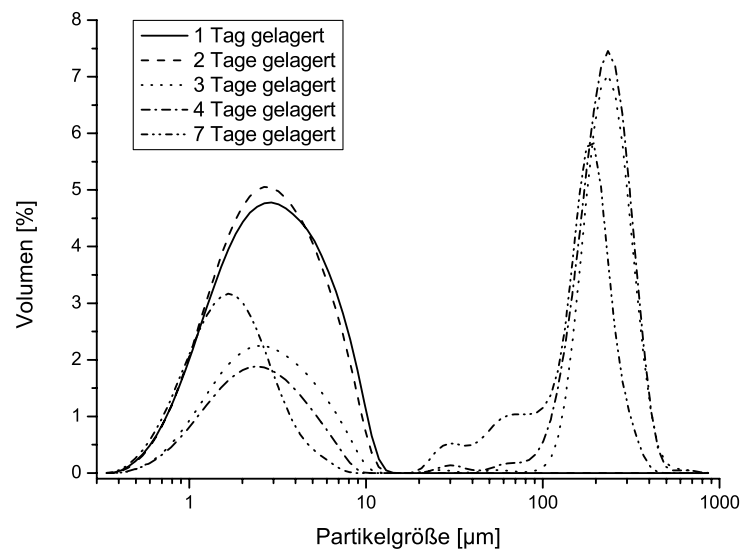


Abbildung 4.48: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (2 % DEET, 20 % Suppocire AM, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 76 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 bis 7 Tage gelagert.

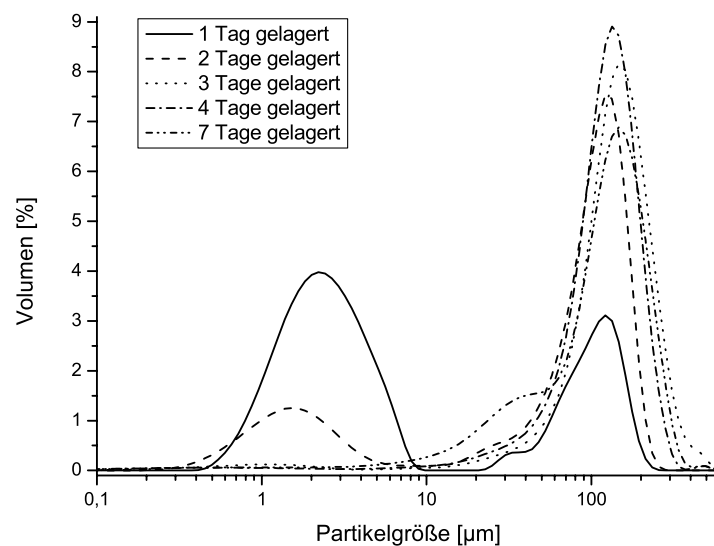


Abbildung 4.49: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (3 % DEET, 20 % Suppocire AM, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 75 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 bis 7 Tage gelagert.

kommt es zum Aufschwimmen der Partikel in der Verdünnung, und ein Auftrag von wenigen Tropfen in die Küvette, kann auch bei gewissenhaftem Durchmischen der Verdünnung nicht immer alle Partikelgrößen erfassen.

Dies spiegelt sich in Proben wieder, bei denen zwar optisch eindeutig eine Anzahl an großen festen Fettpartikeln ausgemacht werden kann, aber bei denen sich trotzdem eine monomodale Verteilung ergibt (Partikelgrößen um $5\ \mu\text{m}$) oder aber die Anzahl der großen Partikel (größer als $20\ \mu\text{m}$) nicht dem erwarteten Wert entspricht. Die Vorgehensweise bei den Messungen konnte dieses Phänomen auf ein Minimum reduzieren.

Auch wenn das Partikelwachstum während der Lagerung nicht in allen Proben wiederzufinden ist, so sind doch klare Tendenzen zu erkennen. Ein DEET-Gehalt von 0 % führt bei den meisten Proben – im Vergleich zu Suspensionen mit höheren Konzentrationen – zu wenigen Partikeln größer als $20\ \mu\text{m}$. 2 und 3 % DEET sorgt für eine relativ große Anzahl an großen Partikeln.

4.4.7.3 Suspensionen mit Suppocire NA50

Der untersuchte DEET-Gehalt von 0–3 % in den Suspensionen ergab sich aus vorhergehenden Stabilitätsbetrachtungen.

Die Partikelgrößenverteilung von Suspensionen mit Suppocire NA50 bleibt im Laufe einer Lagerung von 7 Tagen annähernd gleich. Der Modalwert der Kurven schwankt kaum. Einzig der Kurvenverlauf von einen Tag gelagerten Suspensionen weicht bei einigen Messungen (siehe 4.50 bis 4.53, auch hier wurden nur die relevanten Kurvenausschnitte dargestellt) von den anderen ab und zeigt einen höheren Modalwert als die länger gelagerten Proben.

Suspensionen mit einem DEET-Gehalt von 0 bzw. 1 % weisen einen Modalwert von ca. $20\ \mu\text{m}$ auf, bei 2 % DEET steigt die häufigste Partikelgröße auf ca. $40\ \mu\text{m}$ an. Eine weitere Erhöhung des DEET-Gehaltes auf 3 % erhöht die häufigste Partikelgröße weiter auf $60\ \mu\text{m}$.

Polarisationsmikroskopische Aufnahmen dieser Suspensionen bestätigen die Vermutung, dass es ab einer DEET-Konzentration von 2 % zur Versinterung der Partikel während der Lagerung kommt. Während die Partikel von Suspensionen mit weniger DEET relativ klein

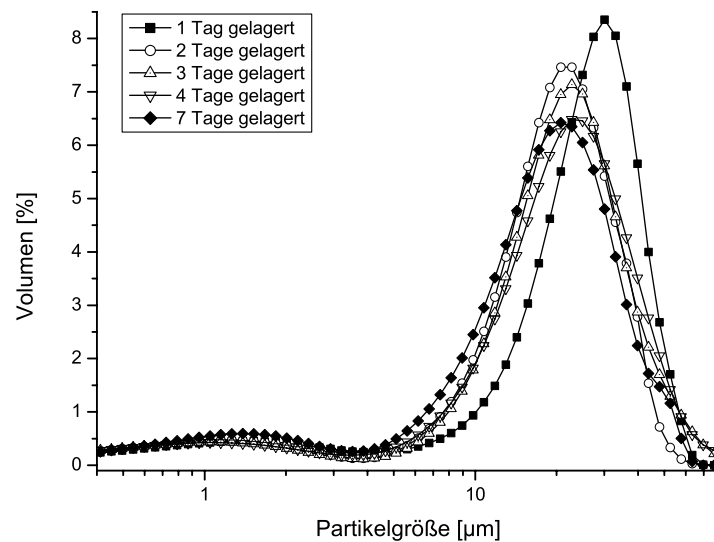


Abbildung 4.50: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (0 % DEET, 20 % Suppocire NA50, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1–7 Tage gelagert (Kurvenausschnitt).

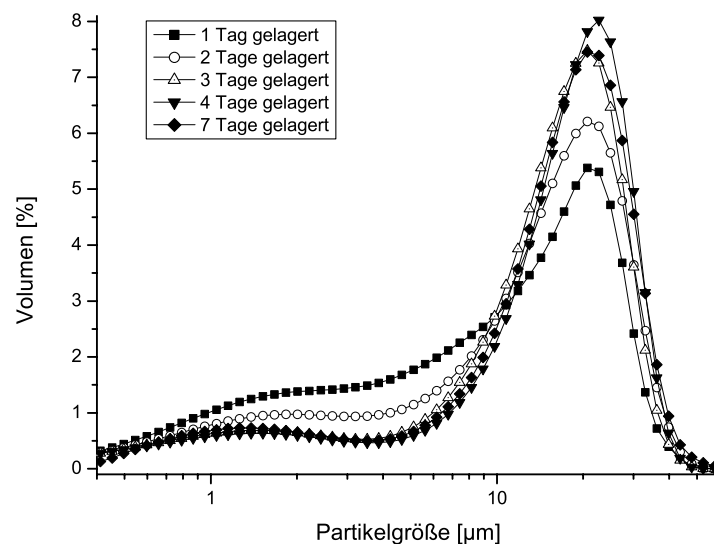


Abbildung 4.51: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (1 % DEET, 20 % Suppocire NA50, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 77 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1–7 Tage gelagert (Kurvenausschnitt).

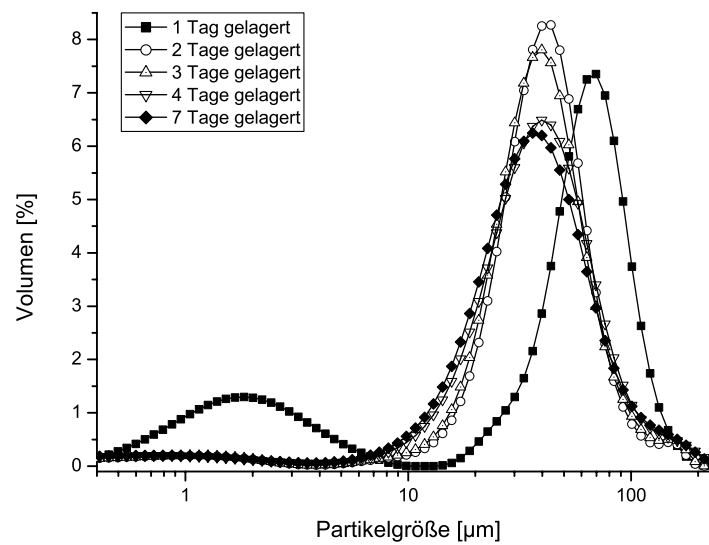


Abbildung 4.52: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (2 % DEET, 20 % Suppocire NA50, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 76 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1–7 Tage gelagert (Kurvenausschnitt).

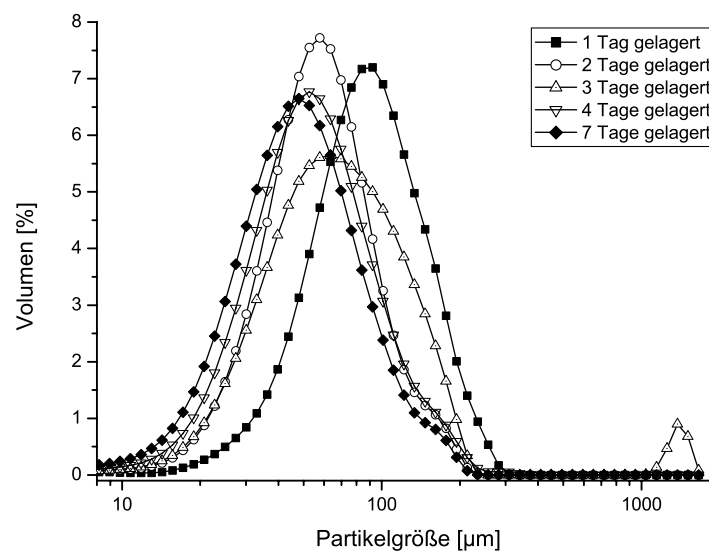


Abbildung 4.53: Partikelgrößenverteilung einer gelagerten Suspension (3 % DEET, 20 % Suppocire NA50, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 75 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1–7 Tage gelagert (Kurvenausschnitt).

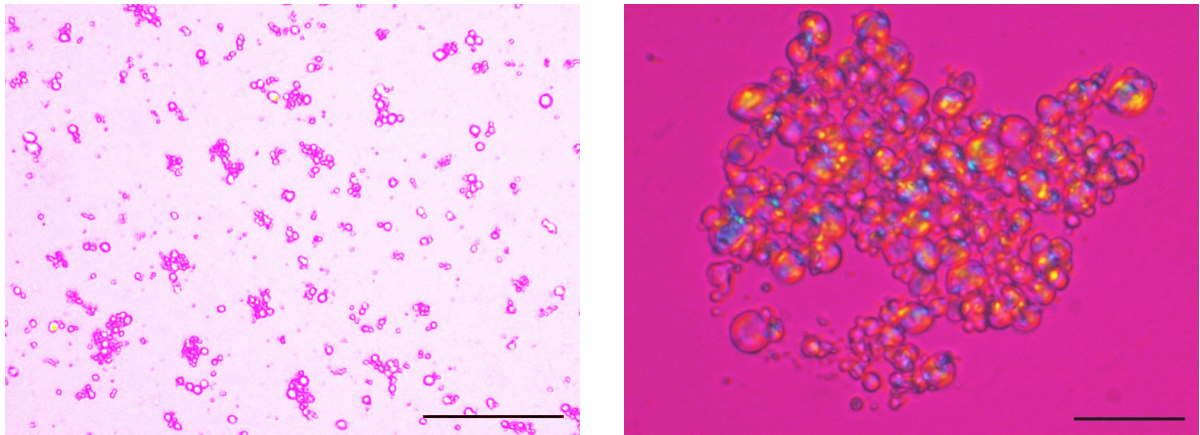


Abbildung 4.54: Polarisationsmikroskopische Darstellung verschiedener Suspensionen (0–1 % DEET, 20 % Suppocire NA50, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 77–78 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 Tag gelagert. Links: 0 % DEET, der Balken entspricht 100 μm . Rechts: 1 % DEET, der Balken entspricht 20 μm .

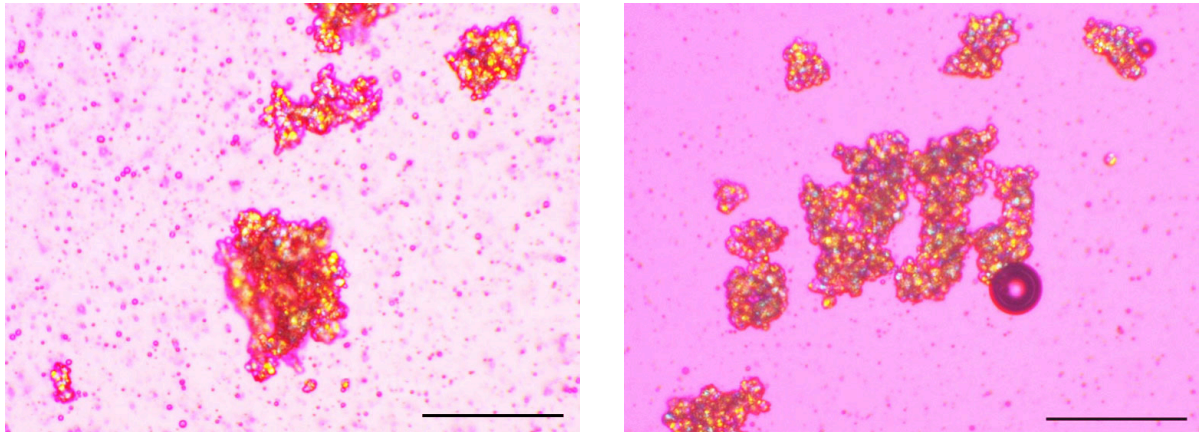


Abbildung 4.55: Polarisationsmikroskopische Darstellung verschiedener Suspensionen (2–3 % DEET, 20 % Suppocire NA50, 2 % Metolose 100, Aqua dem. 75–76 %, konserviert mit 0,005 % Thiomersal) – 1 Tag gelagert. Der Balken entspricht jeweils 20 μm . Links: 2 % DEET, rechts: 3 % DEET.

bleiben, kommt es bei höheren DEET-Gehalten zu ausgeprägter Versinterung und somit zu großen Partikeln. Die Versinterung findet innerhalb des ersten Tages der Lagerung statt: Abb. 4.54 und 4.55 zeigen Proben, die einen Tag gelagert wurden; die 7 Tage gelagerten Proben unterscheiden sich nicht von den dargestellten.

Die auffällige Abweichung zwischen einem Tag und längerer Lagerung bei einigen der Systeme findet sich in der Reproduktion nicht wieder. Da die Messungen alle an einem Tag durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sie die Folge einer leicht abweichenden Probenaufbereitung sind.

Wie bei Suspensionen mit Suppocire AM bildet sich auch hier eine dritte Phase aus kleinen Lipidtröpfchen. Das Volumen dieser dritten Phase ist abhängig von Lagerdauer und DEET-Gehalt.²

DEET-haltige Suspensionen auf der Grundlage von Suppocire NA50 sind also bis zu einem DEET-Gehalt von 1 % über 7 Tage stabil. Ab einem DEET-Gehalt von 2 % kommt es zu einer Versinterung der Partikel während der Lagerung und somit zu einem Partikelgrößenwachstum.

Diese Beobachtungen gehen konform mit den DSC-Messungen der DEET-Lipid-Gemische, die zeigten, dass ein höherer DEET-Gehalt eine stärkere Veränderungen des Lipid-DEET-Gemisches während der Lagerung bewirkt. Der Einfluss dieser Veränderung auf die Lagerstabilität der Suspensionen schlug sich in den Ergebnissen der Teilchengrößenuntersuchungen nieder.

²Die Reproduktion der Versuche weist die gleichen Tendenzen aber andere Absolutwerte auf. Diese Abweichung findet ihre Begründung wahrscheinlich in einer ungewollten kurzfristigen Änderung der Lagertemperatur während des ersten Tages der Lagerung auf 25–30 °C.

Kapitel 5

Abschlussdiskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hypromellosestabilisierte DEET-haltige Lipidsuspensionen auf Hartfettbasis untersucht. In einer früheren Arbeit [Schepper 1999] hatten sich ähnliche Suspensionen mit reinen Triglyceriden bei Lagerung als instabil erwiesen. Die Partikel versinterten und die Struktur der Suspensionen ging verloren.

Die Verkapselung vom Repellent DEET in die innere Phase eines dispersen Systems bewirkt eine langsamere Abgabe des Wirkstoffs an seine Umgebung [Domb 1993, Domb und Marlinsky 1995, Hannibal et al. 1992, Mehr et al. 1985]. Dies hat sowohl eine längere Wirkung als auch eine geringere Hautpenetration des leicht resorbierbaren [Schmidt et al. 1959, Selim et al. 1995] und giftigen [EPA 1998] Stoffs zur Folge. Der letztere Vorteil muss als ausschlaggebend betrachtet werden, da die Wirkzeit nicht nur auf das Abdampfen und damit langsame Verschwinden des Stoffs von der Haut beschränkt ist sondern auch durch andere Einflussfaktoren wie Abrasion, Abwaschen oder Wind [Maibach et al. 1974] beeinflusst wird.

Einbettung von DEET in die innere Phase einer Emulsion wurde von der Firma Bayer mit dem Produkt Autan Family viele Jahre erfolgreich praktiziert. Eine stabile Suspension könnte das Abdampfen des Repellents weiter verlangsamen. Während die Diffusion in die äußere Phase einer Emulsion hauptsächlich durch den hohen Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von DEET beschränkt wird, ist in einer Suspension der Wirkstoff von Kris-

tallen oder hochviskosen amorphen Stoffen umgeben, die er überwinden muss, um in die wässrige Phase zu diffundieren.

Die Klärung der Ursachen für die beobachteten Instabilitäten der Suspensionen, die auch in dieser Arbeit bei Verwendung anderer Lipidgrundlagen als Triglyceriden beobachtet werden konnten, und der Versuch der Lokalisation des DEET im kristallisierten Lipid war Ziel dieser Arbeit.

Als innere Phase der Suspension wurden Hartfette der Fa. Gattefossé ausgewählt, wobei auf eine breite Verteilung der Hydroxylzahlen und somit der Hydrophilie der Grundlagen geachtet wurde. Die Vorteile von Hartfetten als Grundlage sind ein variabler Schmelzpunkt, so dass Fette herausgesucht werden konnten, die bei Raumtemperatur fest sind, eine variable Polarität, eine gute Hautverträglichkeit und eine große Ähnlichkeit zu Triglyceriden, die sich als geeignete Wirkstoffträger für Emulsionen herausgestellt hatten. Die Wahl fiel auf Suppocire AM (Hydroxylzahl 10), Suppocire C (Hydroxylzahl 20–30) und Suppocire NA50 (Hydroxylzahl 38–48). Als relativ heterogenes Gemisch sind Hartfette eher als reine Triglyceride in der Lage, eine bei Raumtemperatur flüssige Substanz wie das DEET aufzunehmen.

Die Heterogenität der Hartfette sorgt durch unterschiedliche Kettenlängen und unterschiedlichen Sättigungsgrad der Fettsäuren für ein verändertes Schmelzverhalten im Vergleich zu Monosubstanzen. Dargestellt wird dieses Schmelzverhalten durch den *Solid-Fat-Index*. Auch in kristallisiertem Zustand sind bestimmte Bereiche der festen Grundlage noch in flüssigem Zustand. Das sorgt dafür, dass DEET eventuell die Möglichkeit hat, sich in diesen Bereichen anzureichern, wenn im regelmäßigen Kristallgitter der langkettigen Bestandteile des Fettes, keine Möglichkeit für den flüssigen Stoff besteht, dort zu verweilen. Diese Bereiche hoher Beweglichkeit sind auch im NMR-Spektrum zu erkennen. Gleichzeitig sorgt die hohe Beweglichkeit innerhalb bestimmter Bereiche der inneren Phase dafür, dass DEET trotzdem entweichen und somit seine gewünschte insektenabwehrende Wirkung entfalten kann. Eine Retardierung im Vergleich zur Emulsion ist aufgrund der kristallisierten Bereiche innerhalb der inneren Phase zu erwarten, die für längere Diffusionswege innerhalb der Partikel und für geringere Abdunstungsflächen auf den Partikeln sorgen. Diffusion durch die Kristalle hindurch findet nur sehr langsam statt.

Hypromellose hat sich als hervorragender Polymeremulgator erwiesen um verschiedenste O/W-Emulsionen und Suspensionen zu stabilisieren. Polymere haben gegenüber den herkömmlichen Tensiden den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer Molekülgröße die Haut nicht penetrieren können. Hypromellose reizt die Haut nicht. Versuche haben gezeigt, dass auf Hypromellose 4000 zu Gunsten von Hypromellose 100 verzichtet werden kann. Hypromellose 4000 liefert zwar ähnlich stabile Suspensionen wie Hypromellose 100, diese sind aber zu viskos für eine topische Anwendung.

Die Abdunstung des DEET wird durch Verwendung von Polymeremulgatoren im Vergleich zu herkömmlichen Tensiden weiterhin verlangsamt. Durch die vergleichsweise geringe Solubilisierung der Polymere wird der Transport von DEET durch die Wasserphase beeinträchtigt. Zusätzlich muss das Verhalten der Systeme auf der Haut in Betracht gezogen werden. Verdunstet das Wasser, bleibt ein hochkonzentriertes Hydrogel auf der Haut zurück, in das die Hartfettpartikel eingebettet sind. Die Abdunstung von DEET durch solch ein Gel ist erheblich verlangsamt.

5.1 Beobachtungen bei der Lagerung der Suspensionen

Die Partikel der Suspensionen neigen zur Agglomeration. Die gleichen Systeme sind über mindestens einen Tag stabil, solange sich die innere Phase im flüssigen Zustand befindet.

Im Ruhezustand bilden die Suspensionen durch die Agglomeration der Lipidpartikel eine Art Gelgerüst, das die Aufrahmung behindert. Dieses „Gelgerüst“ sorgt dafür, dass die Masse der Lipidpartikel nur in seiner Gesamtheit aufrahmen kann, wodurch es bei niedriger Polymerkonzentration zu einer Dreischichtbildung bei der Lagerung kommt. Auf der Suspension befindet sich eine feste Lipidschicht, die durch Versinterung von flotierten Partikeln entsteht, mittig das „Gelgerüst“ der agglomerierten Partikel und unten eine wässrige Schicht, die nur vereinzelte Lipidpartikel enthält. Bei hoher Polymerkonzentration wird das zunächst gießfähige System zu einer hochviskosen Suspension mit Fließgrenze.

Bei Lagerung kommt es zu Formveränderungen der Partikel, in geringem Maße zu Größenwachstum, Verkleinerung und zur Versinterung von Partikeln. Unter dem Polarisati-

onsmikroskop ist gut zu erkennen, wie die einzelnen Partikel zunächst agglomerieren und dann nach und nach ihre Individualität verlieren. Im Extremfall sind überhaupt keine einzelnen Partikel mehr zu erkennen und die Suspension wird zu einem unstrukturierten, streichfähigen System.

Die DEET-Konzentration hat einen direkten Einfluss auf die Stabilität der Suspension. Suspensionen ohne DEET auf Grundlage von Suppocire C und NA50 waren über mehrere Monate stabil. Schon eine Konzentration von 1 % DEET verursacht ein Versintern der Lipidpartikel innerhalb von Tagen oder wenigen Wochen. Ein Anteil von 3 % DEET destabilisiert die Suspension derart, dass schon innerhalb des ersten Tages Lagerung ein Großteil der Partikel versintert. Die verschiedenen Lipide reagieren zwar unterschiedlich auf DEET, aber die Tendenz, dass sich eine Erhöhung der DEET-Konzentration negativ auf die Stabilität auswirkt, zeigt sich in allen Systemen.

5.2 Mischbarkeit von DEET mit Hartfett

Um die Systeme zu charakterisieren wurde die Mischbarkeit von DEET und Hartfett und die Stabilität der Mischung während der Lagerung untersucht.

DEET war mit allen verwendeten Hartfetten im flüssigen Zustand mischbar. Ein Erkalten der Mischung zeigte zunächst keine Phasenseparation. Während der Lagerung bei 20 °C kam es allerdings bei manchen Mischungen zu einer Trennung der Phasen. Suppocire NA50 und DEET zeigen nach 20 Tagen Lagerung eine Entmischung sogar bei einer niedrigen DEET-Konzentration von 10 %, während Suppocire C unter gleichen Bedingungen eine Entmischung erst bei 50 % DEET zeigt. Suppocire AM und 10 % DEET separieren sich in dieser Lagerzeit nicht, höhere DEET-Konzentrationen von 35 % und 50 % hingegen schon.

Eine Phasenseparation der inneren Phase einer Suspension kann zu Instabilitäten führen, die erst nach längerer Zeit zu beobachten sind. Bei der Herstellung lagert sich der Polymeremulgator an der Oberfläche der dispergierten Phase an. Die noch geknäuelten Moleküle lagern sich um und verankern sich an der Oberfläche. Das Kristallisieren des Fettes verändert diese Verankerung zwar, ihre Festigkeit wird aber nicht geschwächt, wie sich aus der

Tatsache ableiten lässt, dass Suspensionen ohne DEET über viele Monate stabil waren. Tritt DEET aus dem Lipidpartikel aus, lagert es sich an der Oberfläche an, da es mit Wasser nur sehr schlecht mischbar ist und kann somit Einfluss auf die Verankerung nehmen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Anwesenheit von DEET an der Partikeloberfläche die Verankerung schwächt, da die Stabilität der Suspensionen mit zunehmendem DEET-Gehalt abnehmen.

5.3 Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenkleinwinkelbeugung liefert starke Indizien für eine lamellare Kristallstruktur bei allen drei Lipiden, dennoch deuten die Diffraktogramme auf eine recht große Unordnung innerhalb der Struktur hin. Das bedeutet, die Lamellarstruktur ist auf kleine Bereiche beschränkt und diese Bereiche unterscheiden sich stark in Größe und Ausrichtung. Reflexe im späteren Verlauf der Diffraktogramme sind sehr klein, teilweise nur zu erahnen oder gar nicht zu sehen. Da in TEM-Aufnahmen treppenförmige Strukturen auf eine Regelmäßigkeit im Kristallaufbau hinweisen, liegt die Vermutung nahe, dass bei den Diffraktogrammen, in denen die Reflexe ganz fehlen, die Peaks zwar vorhanden, aber im Grundrauschen nicht zu erkennen sind.

Suppocire AM bildet bei der Zumischung von DEET nicht die gleichen zusätzlichen Reflexe wie die anderen Fette. Die DSC-Untersuchungen (s. u.) zeigen allerdings, dass eine zweite Struktur vorliegen muss. Offensichtlich ist diese Struktur jedoch nicht mit SAXD darstellbar.

Röntgenweitwinkeluntersuchungen zeigen, dass ein Zusatz von DEET bei allen drei Lipiden bewirkt, dass das Fett in relativ kurzer Zeit ein einheitliches oder zumindest sehr ähnliches Reflexmuster annimmt. Eine erhöhte DEET-Konzentration beschleunigt diese Umwandlung. Ob die Umwandlungsgeschwindigkeit dabei einen Maximalwert erreicht, lässt sich aus den durchgeführten Versuchen nicht sagen, da nur drei Konzentrationen untersucht wurden. Eine Erhöhung des DEET-Gehalts von 30 % auf 50 % (höchste untersuchte DEET-Konzentration) bewirkt bei allen Fetten eine Beschleunigung.

Suppocire NA50 kristallisiert nach einem Zusatz von DEET genauso wie die anderen Lipide, das Diffraktogramm des unbehandelten Lipids ist allerdings unterschiedlich. Da die Herstellungsmethode der Lipidplättchen nicht bekannt ist, kann dies eine Auswirkung einer anderen Herstellungsmethode als bei Suppocire C oder Suppocire AM sein.

Ein Zusatz von DEET vereinheitlicht also das Kristallisationsverhalten der Fette. Nach 18 Tagen Lagerung weisen alle Mischungen Reflexbilder auf, die kaum differieren. Für einen Erklärungsversuch dieser Tatsache müssen die Heterogenität der Hartfette und die Tatsache bedacht werden, dass DEET auch bei Raumtemperatur im Gegensatz zu den Lipiden flüssig ist. Die langkettigen Anteile der Lipide kristallisieren bei einer Lagerung bei Raumtemperatur aus und verdrängen das DEET. Die kurzkettigen Anteile bleiben im DEET gelöst. Die Vereinheitlichung der Kristalle durch das DEET lässt den Schluss zu, dass sich in jedem Lipid die gleichen Kristalle bilden, und unterschiedliche Lipidbestandteile im DEET gelöst bleiben. Ein Einbau von DEET in einen Lipidkristall würde diesen und damit das Röntgendiffraktogramm verändern, was den Schluss nahe legt, dass das DEET auch im Lipid in flüssiger Form vorliegt. Bei Lagerung wird das Repellent also aus den Kristallen verdrängt und gelangt so an die Oberfläche der Lipidpartikel. Ein erhöhter DEET-Gehalt bedeutet eine schnellere Verdrängung durch sich bildende Kristalle.

Teile der Hartfettes liegen nach dem Mischen im DEET gelöst vor. Dies fraktionierte Lösen des Lipids im DEET verändert aber nur die Kristallisationsgeschwindigkeit, nicht aber die Kristalle selbst, sonst würden sich die Diffraktogramme von reinem geschmolzenem und wieder erkaltetem Hartfett von denen der Mischungen unterscheiden. Da der Halo des amorphen DEET die Diffraktogramme teilweise überdeckt, sind zwar leichte Veränderungen im Kristallisationsverhalten nicht ganz auszuschließen, doch da die Hauptpeaks identisch sind, ist keine große Veränderung zu erwarten.

5.4 Schmelzverhalten der gelagerten Proben

Mischungen von DEET und Hartfett haben wie erwartet einen niedrigeren Schmelzpunkt als das reine Hartfett. Durch langsame Umwandlung zwischen den verschiedenen Modifikationen des Hartfettes kommt es zu einer langsamen Erhöhung des Schmelzpunktes

während der Lagerung, wobei die Schmelzpunktdepression als solche erhalten bleibt. Die Schmelzkurven der gelagerten Proben laufen ungefähr parallel. Tendenziell kann bei höherem DEET-Gehalt von einem niedrigeren Schmelzpunkt ausgegangen werden.

Die Veränderungen der Mischungen während der Lagerung sind nach ca. 2 Wochen abgeschlossen, was sich in einem konstanten Schmelzpunkt und in einem unveränderten Kurvenverlauf der Schmelzkurve zeigt. Suppocire AM bildet eine Ausnahme; erst nach ca. 6 Wochen ist die Veränderung stark verlangsamt. Ein zweiter Peak, der sich durch Zumischung von DEET vor dem Hauptschmelzpeak bildet, deutet auf eine zweite Struktur hin. Diese lässt sich mit SAXD nicht darstellen.

Die Schmelzkurven zeigen, dass die Beimischung von DEET Einfluss auf die Lipidstruktur hat und dass sich diese während der Lagerung verändert. Je größer der DEET-Anteil, desto größer ist der Einfluss. Eine Veränderung der Lipidstruktur muss Auswirkungen (abweichende Stabilität o. ä.) auf eine Suspension mit diesem Lipid haben.

5.5 Abkühlvorgang

Die Lipidsuspensionen zeigen während der Abkühlung noch keine Tendenz zur Versinterung. Zunächst kristallisieren die großen Lipidpartikel bei der Abkühlung, wohingegen die kleinen Partikel eine unterkühlte Schmelze bilden. Den kleinen Partikeln fehlt vermutlich der Kristallisationskeim und sie kristallisieren dementsprechend erst nach Lagerung. Im Laufe der Lagerung ist eine Zunahme der kristallinen Anteile in allen Fällen zu beobachten.

Die Agglomeration der Partikel ist hingegen schon früh zu erkennen. In allen Proben (mit Ausnahme der Suspension mit Suppocire C und 3 % DEET) ist deutlich zu sehen, dass die Agglomeration der Teilchen von der Temperatur abhängt und vom DEET-Gehalt beeinflusst wird. Die Zubereitungen mit Suppocire AM als Grundlage liefern ein eindeutiges Ergebnis: Eine Suspension bei einer Temperatur von 10 °C ohne DEET-Zusatz weist keine Agglomeration auf. Bei einer Suspension mit einem DEET-Gehalt von 3 % ist ab einer Temperatur von 20 °C eine Agglomeration der Teilchen zu beobachten, bei einer Erhöhung

des DEET-Gehalts auf 5 % ist schon zu Beginn der Untersuchung eine Agglomeration zu erkennen. Suspensionen mit Suppocire C als Grundlage liefern ein weniger deutliches Ergebnis, aber auch bei diesen Proben wird die Agglomeration von der Temperatur und dem DEET-Gehalt beeinflusst.

Eine Versinterung ist während des Abkühlvorgangs nicht zu beobachten, der Versinterungsprozess ist also nicht ausschließlich temperaturabhängig, die Zeit ist als zweiter Faktor in den Vorgang mit einzubeziehen.

Zwei Phänomene können für einen Erklärungsversuch herangezogen werden: Auch bei Temperaturen weit unter dem Schmelzpunkt der DEET-Lipid-Mischung sind viele Partikel noch nicht kristallisiert. Eine Versinterung der Partikel kann unter diesen Umständen natürlich nicht stattfinden, weil die wenigen Kristalle nicht miteinander in Berührung stehen. Koaleszens der flüssigen Lipid-DEET-Gemische tritt nicht auf, wie Vorversuche gezeigt haben (s. o.).

Als zweiter Punkt muss die Kristallstruktur der Lipidpartikel in Betracht gezogen werden: Kurz nach dem Beginn der Kristallisation sind die kristallinen Bereiche noch klein. Im Laufe der Lagerung wachsen die Kristalle an, zunächst kristallisieren langkettige Moleküle, dann die kurzkettigen Bestandteile. Flüssige Bestandteile werden aus den geordneten Kristallen verdrängt, wodurch eine Art „Phasentrennung“ entsteht, wie in Kap. 5.2 beschrieben ist. Die Anreicherung von DEET an der Partikeloberfläche hat wiederum Auswirkungen auf die Assoziation zwischen Partikeloberfläche und Molekül des Polymeremulgators.

5.6 Teilchengrößenmessungen

Die Teilchengröße ist ein wichtiges Stabilitätskriterium von dispersen Systemen, weshalb Stabilitätsuntersuchungen mit einem Teilchengrößenmessgerät unternommen wurden. Die Suspensionen wurden 7 Tage lang täglich einmal vermessen.

Suspensionen mit einer Lipidphase aus Suppocire C weisen eine andere Stabilität in Abhängigkeit vom DEET-Gehalt auf als die anderen Hartfette. Bei der Kristallisation des Fettes nach der Herstellung kommt es zur Flockung der Partikel. Ein DEET-Gehalt von

bis zu 1 % bewirkt eine partielle Desagglomeration innerhalb einer Woche, was zu einer effektiven Verkleinerung der gemessenen Partikelgrößen führt. Bei diesem DEET-Gehalt sind die Suspensionen länger als eine Woche stabil. Bei 2 % DEET-Gehalt bleibt die gemessene Partikelgröße innerhalb des Beobachtungszeitraums nahezu gleich, obwohl es zu einer Umstrukturierung der Partikel kommt. Ein größerer DEET-Gehalt fördert eine Versinterung der Partikel, so dass die Partikelgröße innerhalb des Messzeitraums zunimmt.

Suspensionen auf der Grundlage von Suppocire AM sind unter den hier beschriebenen Herstellungsmethoden nicht stabil. Im Laufe der Lagerung bildet sich ein drei-phasiges System bestehend aus der äußeren wässrigen Phase, Lipidkristallen in einer Größe von $>20\text{ }\mu\text{m}$ und einer flüssigen Lipidphase, die sich aus Tropfen von $<20\text{ }\mu\text{m}$ zusammensetzt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Größe und Anzahl der Kristalle, dem DEET-Gehalt der Probe und der Lagerdauer, wobei lange Lagerdauer und hoher DEET-Gehalt größere Kristalle bewirken. Selbst in Abwesenheit von DEET bilden sich Kristalle, die innerhalb von zwei Tagen Lagerdauer anwachsen.

Suspensionen mit Suppocire NA50 als Lipidphase sind bis zu einem DEET-Gehalt von 1 % über 7 Tage stabil. Ab einem DEET-Gehalt von 2 % kommt es zu einer Versinterung der Partikel während der Lagerung und somit zu einem Partikelwachstum.

Die Teilchengrößenmessungen gehen teilweise mit den bereits beschriebenen Entmischungsbeobachtungen konform. Suppocire C erweist sich als am besten geeignet, um DEET aufzunehmen. Gleichzeitig liefert es auch die stabilsten Suspensionen. Lipid/DEET-Mischungen mit den beiden anderen Hartfetten sind nicht stabil mit Ausnahme von Suppocire AM mit 1 % DEET. Die Tatsache, dass Suppocire NA50-DEET-Gemische die größten Entmischungstendenzen bei der Lagerung zeigen, aber Suspensionen mit Suppocire NA50 stabiler sind als mit Suppocire AM, scheint diesem Ergebnis zunächst zu widersprechen. Hierbei muss bedacht werden, dass die Suspension nur über 7 Tage stabil ist. Beobachtungen über längere Zeiträume haben ergeben, dass alle DEET-haltigen Suspensionen instabil sind. Außerdem entspricht 1 % DEET in einer Suspension mit 20 % Lipidphase nur einem DEET-Gehalt von 5 % im Hartfett, Entmischungstendenzen lassen sich aber aus in Kap. 4.3.1 beschriebenen Gründen nur in großer Ausprägung eindeutig erkennen. Da alle Suspensionen Instabilitäten aufweisen, ist zu vermuten, dass geringe Entmischungen bei jeder Mischung stattfanden.

Die Phasenseparation und die in Kap. 5.5 beschriebene Veränderung der Modifikationen sind aller Wahrscheinlichkeit nach für die Instabilität verantwortlich. Da beide Phänomene erst nach einer gewissen Lagerdauer auftreten, ist auch die Versinterung der Partikel erst nach einer gewissen Zeit zu beobachten.

5.7 Abschlussbetrachtung

Die Beobachtungen dieser Arbeit haben zu der in Abb. 5.1 dargestellten Strukturvorstellung geführt.

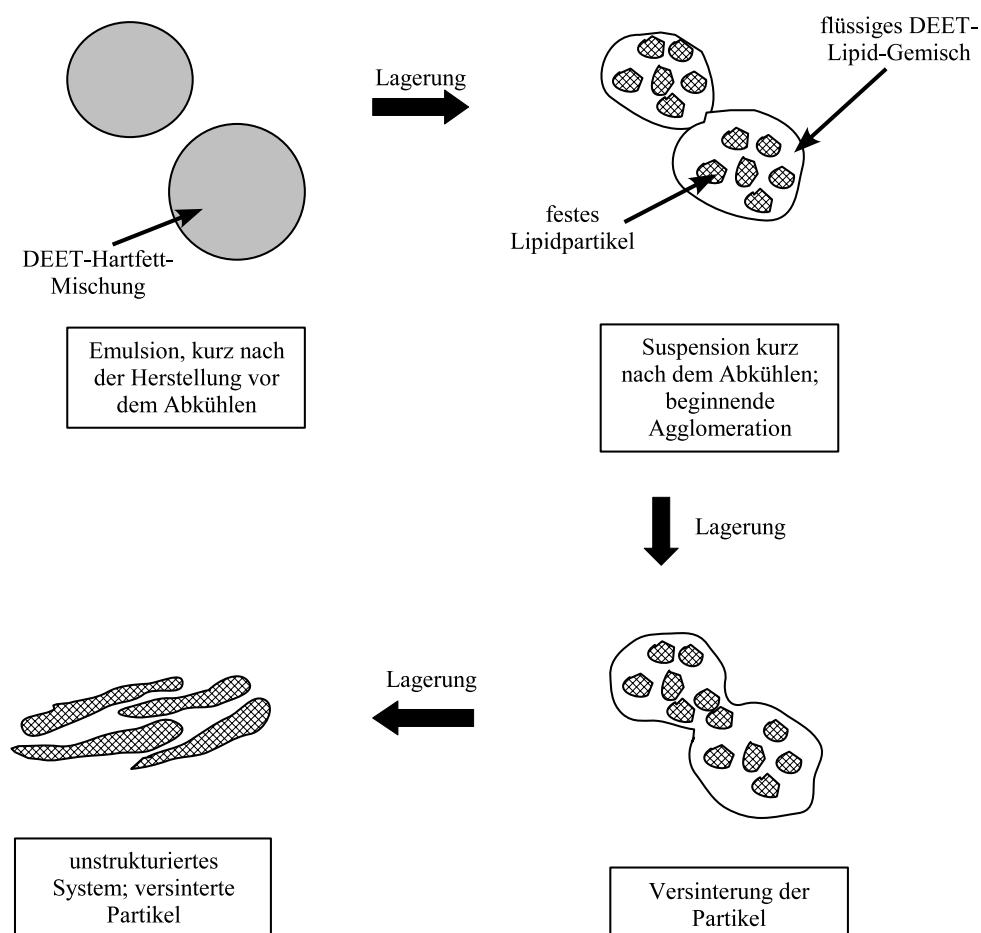


Abbildung 5.1: Strukturvorstellung von gelagerten DEET-haltigen polymerstabilisierten Suspensionen auf Hartfettbasis

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Wirkstoff DEET bei Lagerung aus den Lipidkristallen verdrängt wird und an die Oberfläche der Partikel gelangt. Eine Phasenseparation kann bei DEET-Hartfett-Gemischen polarisationsmikroskopisch beobachtet werden. Die Ergebnisse der WAXD-Analysen weisen darauf hin, dass sich DEET mit Anteilen des Hartfetts mischt, bzw. diese teilweise löst. Außerdem zeigen sie, dass in den Gemischen Kristalle vorliegen, die unabhängig vom DEET-Gehalt sind. Diese Kristalle wachsen im Laufe der Lagerung an und separieren sich von den flüssigen Anteilen des Gemisches.

An der Oberfläche der Partikel beeinflusst das Gemisch an konzentriertem DEET und flüssigem Lipid den Polymeremulgator wahrscheinlich durch ein Lösen der Verankerung der Moleküle auf der Lipidoberfläche, was eine Instabilität verursacht. Das Ergebnis ist eine starke Versinterung der Partikel.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Stabilität und Lagerverhalten von hypromellosestabilisierten DEET-haltigen Suspensionen auf Hartfettbasis untersucht. Derartige Systeme sind interessant, da der Einschluss des Repellents DEET in eine polymerstabilisierte Suspension erwartungsgemäß die Abgabe des Wirkstoffs an Umgebung und Haut verringern sollte, was die Verträglichkeit und auch die Wirkdauer positiv beeinflussen würde. Polymere sind hautverträglicher als herkömmliche Tenside und bilden durch eine um die Lipidpartikel gelagerte hochviskose Schicht eine zusätzliche Diffusionsbarriere. Das Verhalten von Hartfetten als Wirkstoffträger fand besondere Beachtung, da sich diese durch sehr hohe Variabilität und Hautverträglichkeit auszeichnen. Drei Hartfette mit unterschiedlichen Hydroxylzahlen kamen zum Einsatz: Suppocire AM, Suppocire C und Suppocire NA50.

Ohne die Anwesenheit von DEET erwiesen sich zwei der drei untersuchten Hartfette als geeignet, um mehrere Monate stabile Suspensionen herzustellen. Die Anwesenheit von DEET destabilisiert die Systeme allerdings. Es kommt zur Agglomeration der nach der warmen Herstellung abkühlenden und kristallisierenden Partikel, was bei längerer Lagerung zu Versinterung führt. Es wurden zwei Formen der Instabilität beobachtet. Die frisch abgekühlten zunächst noch gießfähigen Suspensionen verfestigen sich mit zunehmender Versinterung zu hochviskosen Systemen mit Fließgrenze. Bei niedrigeren Polymerkonzentrationen kommt es zu einer Dreischichtenbildung. Eine feste Lipidschicht aus versinterten Lipidpartikeln

schwimmt auf einer Schicht, die aus einer Art Gelgerüst aus agglomerierten und teilweise versinternten Partikeln besteht, die sich wiederum auf einer wässrigen Schicht befindet, in der nur noch vereinzelte Lipidpartikel vorhanden sind.

Teilchengrößenmessungen bestätigen, dass DEET einen direkten Einfluss auf die Stabilität der Systeme hat. Während der Lagerung kommt es zu einem Anwachsen der Teilchen. Die Geschwindigkeit der Teilchengrößenzunahme ist abhängig vom DEET-Gehalt der Proben. Suppocire AM liefert dreiphasige disperse Systeme aus versinternden festen Lipidkristallen, flüssigen Lipidtröpfchen und einer wässrigen Außenphase.

Mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich DEET und Lipid bei der Lagerung trennen, wenn größere DEET-Konzentrationen Anwendung finden. Mischungen zwischen dem Wirkstoff und Suppocire C sind am längsten stabil.

Auch mit DSC ermittelte Schmelzkurven zeigen den Einfluss von DEET auf das Verhalten der Lipide. Ein einmaliges Aufschmelzen der Hartfette hat nur geringe Auswirkung auf die Schmelzkurven. Die Addition von DEET bewirkt eine Veränderung des Schmelzverhaltens abhängig vom DEET-Gehalt, die mit einer Schmelzpunktdepression einhergehen. Bei Lagerung verändert sich das Schmelzverhalten kontinuierlich, wobei die Veränderungen bei Suppocire C und NA50 nach ca. 2 Wochen abgeschlossen sind, während sie sich bei Suppocire AM erst nach 6 Wochen stark verlangsamen.

Die Untersuchungen mit Hilfe der Röntgenweitwinkelbeugung führen viele der Untersuchungen zusammen. Die Diffraktogramme verschiedener DEET-Lipid-Mischungen zeigen, dass ein Zusatz von DEET zu einem Lipid zu einer Vereinheitlichung der Kristallstruktur führt. Dies legt den Schluss nahe, dass einige Stoffe aus der Glyceridmischung vom DEET herausgelöst werden bzw. sich mit diesem mischen und auch bei Lagerung in diesem Zustand bleiben. Die verbleibenden Glyceride kristallisieren zu einem einheitlichen Kristall. Ein Anwachsen der Kristalle während der Lagerung kann ein Verdrängen des flüssigen DEET aus den Lipidpartikeln bewirken.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass DEET bei Lagerung aus den Lipidpartikeln der Suspensionen austritt und durch Interaktion mit dem stabilisierenden Polymerfilm Agglomeration und anschließende Versinterung der Partikel herbeiführt.

Literaturverzeichnis

- [Ashton et al. 1986] Ashton P., Hadgraft J., Walters K. A.: Effects of surfactants in percutaneous absorption. *Pharm Acta Helv* 61 (1986) 228–235
- [Badolo et al. 2004] Badolo A., Ilboudo-Sanogo E., Ouédraogo A. P., Constantini C.: Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Trop Med Int Health* 3 (9) (2004) 330–334
- [Barnard et al. 2002] Barnard D. R., Bernier U. R., Posey K. H., Xue R.-D.: Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Everglades National Park. *J Med Entomol* 39 (6) (2002) 895–899
- [Barry 1987] Barry B. W.: Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Contr Release* 6 (1987) 85–97
- [Bayer AG] Autan: Ektoparasiten – Gefahren und Prophylaxe. Informationsbroschüre der Bayer AG (D-Köln)
- [Bell et al. 2002] Bell J. W., Veltri J. C., Page B. C.: Human exposures to N,N-diethyl-m-toluamide insect repellents reported to the american association of poison control centers 1993–1997. *Int J Toxicol* 21 (2002) 341–352

- [Berner et al. 1989] Berner B., Juang R. H., Mazzenga G. C.: Ethanol and water sorption into human stratum corneum and model systems. *J Pharm Sci* 78 (1989) 472–476
- [BgVV und RKI 1996a] Herausgeber: BgVV, RKI: Lyme-Borreliose - Erkennung und Verütung. Merkblatt für Ärzte, Best-Nr.: 60056 (1996)
- [BgVV und RKI 1996b] Herausgeber: BgVV, RKI: Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) - Erkennung und Verütung. Merkblatt für Ärzte, Best-Nr.: 60054 (1996)
- [Blomquist und Thorsell 1977] Blomquist L., Thorsell W.: Distribution and fate of the insect repellent ^{14}C -N,N-diethyl-m-toluamide in the animal body. II. Distribution and excretion after cutaneous application. *Acta Pharmacol et Toxicol* 41 (1977) 235–243
- [Bouwstra et al. 1992] Bouwstra J. A., Gooris G. S., Salomons-de Vries M. A., van der Spek J. A., Bras W.: Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: a wide-angle x-ray diffraction study. *Int J Pharm* 84 (1992) 205–216
- [Brown und Hebert 1997] Brown M., Hebert A. A.: Insect repellents: an overview. *J AM Acad Dermatol* 36:2 Pt 1 (1997) 243–249
- [Browne 1977] Browne L. B.: Host related responses and their suppression: some behavioural considerations. In: McKelvey J. J. (Hrsg.): *Chemical control of insect behaviour*. John Wiley & Sons, New York (1977) 117–127
- [ChemicalLand] Homepage der Fa. ChemicalLand21 (Seoul, Korea) <http://www.chemicaland21.com/arokorhi/index.html> (abgerufen Januar 2005)

- [CDC 2002] Center for Disease Control and Prevention: West Nile Virus Infection and Breastfeeding: Information for Clinicians. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/WNVClinicianBreastfeeding.doc> (2002)
- [CDC 2003] Center for Disease Control and Prevention: Pregnancy, breastfeeding, and travel. http://www.cdc.gov/travel/mal_preg_pub.htm (2001)
- [Charlet und Finkel 1987] Charlet E., Finkel P.: Repellentien zur Anwendung auf der Haut. SÖFW-Journal 10 (1984) 297–300
- [Clem et al. 1993] Clem J. R., Havemann D. F., Raebel M. A.: Insect repellent (N,N-diethyl-m-toluamide) cardiovascular toxicity in an adult. Ann Pharmacother 27 (3) (1993) 289–293
- [Constantini et al. 2004] Costantini C., Badolob A., Ilboudo-Sanogob E.: Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against anopheles gambiae complex and other afrotropical vector mosquitoes. Trans R Soc Trop Med 98 (2004) 644–652
- [Corbo et al. 1993] Corbo M., Schultz T. W., Wong G. K., Van Buskirk B. A.: Development and validation of in vitro release testing methods for semisolid formulations. Pharm Technol (1993) 114–128
- [Daniels und Barta 1991] Daniels R., Barta A.: Preparation, characterization, and stability testing of oil-in-water emulsions with hydroxypropyl methyl cellulose as emulsifier. PZ Wissenschaft 4 (4) (1991) 177–183
- [Daniels und Rimpler 1993] Daniels R., Rimpler S.: Effect of heat sterilization on the stability of o/w emulsions containing hydroxypropyl methyl cellulose as emulsifier. Pharm Pharmacol Letters 3 (3) (1991) 80–83

- [Daniels 2001] Daniels R.: Galenische Prinzipien moderner Hautpflegeprodukte. Skin Care Forum 25 (2001) http://www.scf-online.com/german/25_d/galenik_25_d.htm
- [Daniels 2002] Daniels R.: Neuartige Gelsysteme. DermoTopics 2 (2002) http://www.dermotopics.de/english/issue_2_02_e/daniels_novelgels_2_02_e.htm
- [Daniels 2004] Daniels, R.: Emulsionen. In: Raab W., Kindl U., Daniels R.: Pflegekosmetik - Ein Leitfaden. Gustav Fischer Verlag Stuttgart (2004)
- [Davis 1985] Davis E. E.: Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (diptera: culicidae). J Med Entomol 22 (3) (1985) 237–243
- [Domb 1993] Domb A. J.: Sustained release formulations of insect repellent. United States Patent 5,221,535
- [Domb und Marlinsky 1995] Domb A. J., Marlinsky A.: Insect repellent formulations of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in a liposphere system: efficacy and skin uptake. J Am Mosq Control Assoc 11(1) (1995) 35–38
- [Domb et al. 1996] Domb A. J., Bergelson L., Amselem S.: Lipospheres for controlled delivery of substances. In: Benita S. (Hrsg.): Microencapsulation : methods and industrial applications. Marcel Dekker, New York (1996)
- [DTG 2004] Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und internationale Gesundheit: Empfehlungen zur Malariavorbeugung. <http://www.dtg.mwn.de/malaria/malproph.htm> (2004)
- [Elias et al. 1979] Elias P. M., Brown, B. E., Fritsch P. O., Goerke R. J., Gray G. M., White R. J.: Localization and composi-

- on of lipids in neonatal mouse stratum granulosum und stratum corneum. *J Invest Dermatol* 73 (1979) 339–348
- [EPA 1998] United States Environmental Protection Agency: Reregistration eligibility decision: deet. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0002red.pdf> (1998)
- [Feldmann und Maibach 1970] Feldmann R. J., Maibach H. I.: Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Dermat* 54 (1970) 399–404
- [Fernweh] Fernweh. Broschüre der Bayer AG, Köln
- [Finkel und Siemer 1986] Finkel P., Siemer E.: Repellents zur dermalen Anwendung. *Apotheker-Journal* (1986) 32–37
- [Fradin und Day 2002] Fradin M. S., Day J. F.: Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med* 347 (1) (2002) 13–18
- [Friberg 1976] Friberg S. E.: Emulsion Stability. In: Friberg S. E. (Hrsg.): *Food Emulsions*. Marcel Dekker, New York (1976)
- [Fritsch 1985] Fritsch P.: Die Haut. In: Zenker W. (Hrsg.): *Anatomie* Bd. 3. Urban und Schwarzenberg, München (1985)
- [Gabel et al. 1976] Gabel M. L., Spencer T. S., Akers W. A.: Evaporation rates and protection times of mosquito repellents. *Mosquito News* 36 (1976) 141–146
- [Hagedorn-Lewecke 1995] Hagedorn-Lewecke U.: Penetration von Sonnenschutzsubstanzen und anderen Verbindungen durch menschliche Haut in vivo. Dissertation Düsseldorf (1995)
- [Hannibal et al. 1992] Hannibal D., Skacel P., Rock M., Knowles J.: DEET bioavailability from lipospheres. *Proceed. Intern. Symp. control. Rel. Bioact. Mater.* 19 (1992)

- [Hawkins und Reifenrath 1984] Hawkins G. S., Reifenrath W. G.: Development of an in vitro model for detecting the fate of chemicals applied to skin. *Fund App Tox* 4 (1984) 133–144
- [Health Canada 2002] Pest Management Regulatory Agency, Health Canada: Re-evaluation decision document RRD2002-01. <http://www.pmr-arla.gc.ca/english/pdf/rrd/rrd2002-01-e.pdf> (2002)
- [Higuchi 1967] Higuchi W. I.: Diffusion models useful in biopharmaceutics. Drug release rate processes. *Pharm Sci* 56 (3) (1967) 315–324
- [Hunter 1986] Hunter R. J.: Emulsions. In: Hunter R. J.: Foundations of colloid science Vol II. Oxford Science Publications (1986) 908–947
- [Idson 1975] Idson B.: Percutaneous absorption. *J Pharm Sci* 64 (1975) 901–924
- [IUPAC 1972] IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), Division of Physical Chemistry: Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, Appendix II, Part I. London: Butterworths (1972) 611
- [Jenning et al. 2000] Jennings V., Mäder K., Gohla S. H.: Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study. *Int J Pharm* 205 (2000) 15–21
- [Khan und Maibach 1972] Khan A. A., Maibach H. I.: A study on insect repellents. 1. Effect on the flight an approach by aedes aegypti. *J Econ Entomol* 65 (5) (1972) 1318–1321

- [Kahn und Maibach 1966] Khan A. A., Maibach H. I.: Quantitaion of effect of several stimuli on landing and probing by aedes aegypti. J Econ Ent 59 (1966) 602–605
- [Kawaguchi und Kubota 2004] Kawaguchi M., Kubota K.: Rheo-optical properties of silicone oil emulsions in the presence of polymer emulsifiers. Langmuir 20 (2004) 1126–1129
- [Klun et al. 2003] Klun J. A., Khrimian A., Margaryan A., Kramer M., Deboun M.: Synthesis and repellent efficacy of a new chiral piperidine analog: comparison with deet and bayrepel activity in human-volunteer laboratory assays against aedes aegypti and anopheles stephensi. J Med Entomol 40 (3) (2003) 293–299
- [LMBG 1998] Kommentar zum Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz (LMBG), Fax vom Industrieverband für Körperpflege und Waschmittel im November 1998
- [Lutz und Jaspersen 1982] Lutz U., Jaspersen H.-P.: Repellentien und Insektenabwehr. DAZ 122 (30) (1982) 1539–1543
- [Maibach et al. 1974] Maibach H. I., Khan A. A., Akers W.: Use of insect repellents for maximum efficiency. Arch Dermat 109 (1974) 32–35
- [McGready et al. 2001] McGready R., Hamilton K. A., Simpson J. A., Cho T., Luxemburger C., Edwards R., Looareesuwan S., White N. J., Nosten F., Lindsay S. W.: Safety of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) in pregnancy. Am J Trop Med Hyg 65 (4) (2001) 285–289
- [McIver 1981] McIver S. B.: A model for the mechanism of action of the repellent DEET on aedes aegypti (diptera: culicidae). J Med Entomol 18 (5) (1981) 357–361

- [Mehr et al. 1985] Mehr Z. A., Rutledge L. C., Morales E. L., Meixsell V. E., Korte D. W.: Loaboratory evaluation of controlled-release insect repellent formulations. *J Am Mosq Control Assoc* 1 (2) (1985) 143–147
- [Melzer 2000] Melzer E.: Herstellung und physikochemische Charakterisierung von W/O-Emulsionen unter Verwendung von Ethylcellulose als nichtionischem Polymeremulgator. Dissertation Braunschweig 2000
- [Moody et al. 1989] Moody R. P., Benoit F. M., Riedel D., Ritter L.: Dermal absorption of the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) in rats and monkeys: effect of anatomical site and multiple exposure. *J Toxicol Environ Health* 26 (1989) 137–147
- [Moody und Nadeau 1993] Moody R. P., Nadeau B.: An automated in vitro dermal absorption procedure: III. In vivo and in vitro comparison with the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide in mouse, rat, guinea pig, pig, human, and tissue-cultured skin. *Toxic in Vitro* 10 (2) (1993) 167–176
- [Müller et al. 1986] Müller B. W. (Hrsg.): Suppositorien - Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik rektal und vaginal anzuwendender Arzneiformen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1986)
- [Müller-Goymann 1999] Müller-Goymann C. C.: Anwendung lyotroper Flüssigkristalle in Pharmazie und Medizin. In: Stegemeyer H. (Herausgeber): *Lyotrope Flüssigkristalle*. Steinkopff, Darmstadt (1999)
- [Neubert et al. 1996] Neubert R., Schmalfuß U., Wohlrab W., Huschka C.: Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation. *Pharm Zeitung* 141 (1996) 1483–1493

- [Niedner und Ziegenmeyer 1992] Niedner R., Ziegenmeyer J. (Hrsg.): Dermatika: therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1992)
- [Osimitz und Grothaus 1995] Osimitz T. G., Grothaus R. H.: The present safety assessment of deet. *J Am Mosq Control Assoc* 11 (2 pt 2) (1995) 274–278
- [Osimitz und Murphy 1997] Osimitz T. G., Murphy J. V.: Neurological effects associated with use of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. *J Toxicol Clin Toxicol* 35 (5) (1997) 435–441
- [Pfeifer et al. 1984] Pfeifer W., Pfügel P., Borchert H.-H.: Grundlagen der Biopharmazie. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1984)
- [Potts und Guy 1992] Potts R. O., Guy R. H.: Predicting skin permeability. *Pharm Research* 9 (1992) 663–669
- [Potts und Guy 1993] Potts R. O., Guy R. H.: The prediction of percutaneous penetration: a mechanistic model. In: Gurny R., Teubner A. (Hrsg.): Dermal and transdermal drug delivery. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1993)
- [Pretorius et al. 2003] Pretorius A.-M., Mogens J., Clarke F., Ringertz S. H.: Repellent efficacy of deet and KBR 3023 against *amblyomma hebraeum* (acari: ixodidae)
- [Qiu et al. 1998] Qiu H., Won Jun H., McCall J. W.: Pharmacokinetics, formulation, and safety of insect repellent N,N-diethyl-3-methylbenzamide (deet): a review. *J Am Mosq Contr Assoc* 14 (1) (1998) 12–27
- [Reifenrath et al. 1991] Reifenrath W. G., Hawkins G. S., Kurtz M. S.: Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: an in vitro-in vivo study. *J Pharm Sci* 80 (1991) 526–532

- [Rietschel und Spencer 1975] Rietschel R. L., Spencer T. S.: Correlation between mosquito repellent protection time and insensible water loss from the skin. *J Invest Dermatol* 65 (1975) 385–387
- [Ross et al. 2004] Ross E. A., Savage K. A., Utley L. J., Tebbett I. R.: Insect repellent interactions: sunscreens enhance DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) absorption. *Drug Metab Disp* 32 (8) (2004) 783–785
- [Rougier et al. 1987] Rougier A., Lotte C., Maibach H. I.: In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic site in humans: predictive assessment by the stripping method. *J Pharm Sci* 76 (6) (1987) 451–454
- [Schepper 1999] Schepper K.: Optimierung und Charakterisierung von topischen Formulierungen mit Insektenrepellents. Dissertation Braunschweig (1999)
- [Schmidt et al. 1959] Schmidt C. H., Acree F., Bowman M. C.: Fate of C¹⁴-diethyltoluamide applied to guinea pigs. *J Econ Ent* 52 (5) (1959) 928–930
- [Schoenig et al. 1994] Schoenig G. P., Neeper-Bradley T. L., Fisher L. C., Hartnagel R. E. jr: Teratologic evaluations of N,N-diethyl-m-toluamide (deet) in rats and rabbits. *Fundam Appl Toxicol* 23 (1) (1994) 63–69
- [Schoenig et al. 1996] Schoenig G. P., Hartnagel R. E., Osimitz T. G., Llanso S.: Absorption, distribution, metabolism, and excretion of N,N-diethyl-m-toluamide in the rat. *Drug Metab Dispos* 24 (1996) 156–163
- [Schulz und Daniels 2000] Schulz, M. B., Daniels, R.: Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *Eur J Pharm Biopharm* 49 (2000) 231–236

- [Selim et al. 1995] Selim S., Hartnagel R. E., Osimitz T. G., Gabriel K. L., Schoenig G. P.: Absorption, metabolism, and excretion of N,N-diethyl-m-toluamide following dermal application to human volunteers. *Fundam Appl Toxicol* 25 (1) (1995) 95–100
- [Sixl 1981] Sixl W.: Zur Frage der Repellents, Situations- und Literaturübersicht. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 173 (1981) 297–411
- [Skinner und Johnson 1980] Skinner W. A., Johnson H. L.: The design of insect repellents. In: *Drug design* Bd. 10 (1980) 277–305
- [Smith et al. 1963] Smith C. N., Gilbert I. H., Gouck H. K., Bowman M. C., Acree F., Schmidt C. H.: Factors affecting the protection period of mosquito repellents. *Technical Bulletin No 1285*, US Department of Agriculture (1963)
- [Smith et al. 1982] Smith W. P., Christensen M. S., Nacht S., Gans E. G.: Effect of lipids on the aggregation and permeability of human stratum corneum. *J Invest Dermatol* 78 (1982) 7–11
- [Snodgras und Johnson 1982] Snodgras H. L., Nelson D. C., Weeks M. H.: Dermal penetration and potential for placental transfer of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. *Am Ind Hyg Assoc J* 43 (1982) 747–753
- [Stinecipher und Shah 1997] Stinecipher J., Shah J.: Percutaneous permeation of N,N-diethyl-m-toluamide (deet) from commercial mosquito repellents and the effect of solvent. *J Toxicol Environ Health* 52 (2) (1997) 119–135
- [Sudakin und Trevathan 2003] Sudakin D. L., Trevathan B. S.: DEET: A review and update of safety and risk in the general population. *J Toxicol Clin Toxicol* 41 (6) (2003) 831–839

- [University of Oxford] Homepage des Department of Chemistry der University of Oxford (GB-Oxford)
<http://www.chem.ox.ac.uk/mom/InsectRepellents/DEET.htm> (abgerufen Januar 2005)
- [Vuleta et al. 1997] Vuleta G., Milic Askrabic J., Simovic S., Vasiljevic D.: Effect of concentraion of polymeric emulsifier on rheological properties of emulsion gels. 2nd World Congress on Emulsions, Bordeaux 1997
- [Westesen 1993] Westesen K., Solid lipid particles, particles of bioactive agents and methods for the manufacture and use thereof. International Patent WO 94/20072 (1993)
- [Westesen und Bunjes 1995] Westesen K., Bunjes H.: Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? Int J Pharm 115 (1995) 129–131
- [Wollenweber et al. 2000] Wollenweber C., Makievski A. V., Miller R., Daniels R.: Adsoption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsions stability. Colloids Surf A 172 (2000) 91–101
- [Zatz 1994] Zatz J. L.: Enhancing skin penetration of sctives with the vehicle. Cosm Toil 109 (1994) 27–35
- [Ziegenmeyer 1986] Ziegenmeyer J.: Haut – Vehikel – Pharmakon, die entscheidenden Kriterien für die percutane Resorption. Pharmazie in unserer Zeit 15 (1986) 129–143